

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
Keemia instituut

Markus Veinla

**HPLC ja FT-ICR-MS tandeminstrumendi arendamine
keerukate looduslike materjalide analüüsimiseks**

Magistritöö materjaliteaduses (30 EAP)

Juhendajad: Anu Teearu-Ojakäär, PhD

Dotsent Koit Herodes, PhD

Tartu 2019

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
1 Infoleht.....	5
2 Sissejuhatus	6
3 Kirjanduse ülevaade	8
3.1 Looduslikku päritolu orgaanilised materjalid ning nende analüüsimise eripärad.....	8
3.1.1 Looduslike vaikude analüüsimine.....	8
3.1.2 Looduslike värvainete analüüsimine.....	9
3.2 Keerukate looduslike proovide analüüsimine	10
3.3 HPLC ja FT-ICR-MS instrumentide ühendamine	11
3.3.1 HPLC tööpõhimõtte ja omadused	11
3.3.2 FT-ICR-MS tööpõhimõtte ja omadused	12
3.3.3 Elektropihustus ionisatsiooniallikas.....	14
4 Eksperimentaalne osa	16
4.1 HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi osade kirjeldus	16
4.1.1 HPLC seade	16
4.1.2 FT-ICR-MS.....	19
4.1.3 HPLC ja FT-ICR-MS instrumentide ühendamine	19
4.2 Proovide ettevalmistamine ja analüüsiparameetrid.....	19
4.2.1 Proovide lahused.....	19
4.2.2 Sisekalibrandid ja nende lisamine eluendivoolule.....	20
5 Tulemused ja arutelu	22
5.1 HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi üldine kirjeldus	22
5.2 Nano-ESI allika modifitseerimine sisekalibrantide lisamiseks.....	24
5.3 FT-ICR massispektri registreerimise kiirendamine	26
5.3.1 Impulssjärjestuse ümber programmeerimine	28
5.3.2 Impulssjärjestuse lühendamine	29

5.3.3	Optimaalsete andmetöötlusparameetrite valimine	30
5.4	HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi rakendamine proovide analüüsimiseks	31
5.4.1	Andmete töötlemise alused	32
5.4.2	Vaiguliste materjalide analüüsimine HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemiga	33
5.4.3	Kermese analüüsimine HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemiga	34
5.4.4	Järeldused proovide analüüsimise kohta HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga	35
6	Kokkuvõte	36
7	Kasutatud allikad	38
8	Lisad	40

Kasutatud lühendid

ADC	Analoog-digitaalmuundur (<i>Analog-to-digital converter</i>)
ESI	Elektropihustusionisatsioon (<i>Electrospray ionization</i>)
FFT	Kiire Fourier' teisendus (<i>Fast Fourier transform</i>)
FT-ICR-MS	Fourier' teisendusega ioonsüklotronresonants-massispektromeetria (<i>Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i>)
GC	Gaaskromatograafia (<i>Gas chromatography</i>)
HPLC	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
IR	Infrapunaspektroskoopia (<i>Infrared spectroscopy</i>)
LC	Vedelikkromatograafia (<i>Liquid chromatography</i>)
m/z	Massi ja laengu suhe (<i>mass to charge ratio</i>)
MeOH	Metanool
nESI	nano-ESI (elektropihustusionisatsioon)
ppm	miljondik osa (<i>parts per million</i>)
QQQ-MS	Kolmekordse kvadrupooliga massispektromeeter (<i>Triple quadrupole mass spectrometer</i>)
TD	Transiendi digitaliseerija (<i>transient digitizer</i>)
UV-Vis	Ultraviolettkiirgus ja nähtav valgus (<i>Ultraviolet and visible radiation</i>)

1 Infoleht

HPLC ja FT-ICR-MS tandeminstrumendi arendamine

keerukate looduslike materjalide analüüsimiseks

Töö eesmärgiks oli välja töötada HPLC ja nESI-FT-ICR-MS instrumente kombineeriv LC-MS süsteem, mida rakendada keeruliste looduslike proovide analüüsimiseks. Süsteemi koostamiseks lahendati kolm ülesannet. Esiteks seati üles süsteem vedelikuvoolu suunamiseks HPLC-st massispektromeetrisse (instrumentide füüsiline ühendamine). Teiseks modifitseeriti nESI allikat nii, et see oleks võimeline ioniseerima korraga kahest eri pihustist tulevat vedelikuvoolu eesmärgiga lisada süsteemi sisekalibrandid FT-ICR-MS mõõtmistäpsuse parandamiseks jaoks. Kolmandaks vähendati FT-ICR-MS massispektri registreerimise ajakulu, milleks loodi uudne optimeeritud mõõteprogramm ning leiti optimaalsed andmetöötlusparameetrid.

Süsteemi testimiseks kasutati looduslikke vaigulisi proove ja värvaineid. Leiti, et väljatöötatud süsteemiga on võimalik edukalt analüüsi läbi viia.

Märksõnad: vedelikkromatograafia, nESI allikas, kõrglahutusega massispektromeetria, LC-MS, keerukad looduslikud proovid. CERCS kood: P300 Analüütiline keemia

Development of an HPLC and FT-ICR-MS tandem-instrument

for the analysis of complex natural materials

The aim of this work was to develop a LC-MS system for the analysis of complex natural materials by combining an HPLC and nESI-FT-ICR-MS. Three problems were solved for the completion of such a system. Firstly, a liquid flow system was developed for directing the flow from the HPLC to the FT-ICR-MS. Secondly, the nESI source was modified in a way that components from two independent liquid flows could be ionized simultaneously so that internal calibration standards could be added to the system for increasing the accuracy of FT-ICR-MS measurements. Thirdly, the frequency of obtaining FT-ICR-MS spectra was increased. For this a new optimized pulse sequence was created and optimal data processing parameters determined.

Natural resinous materials and dyes were used for testing the system. It was concluded that successful analysis could be carried out with the system.

Keywords: liquid chromatography, nano-ESI source, high-resolution mass spectrometry, LC-MS, complex natural samples. CERCS code: P300 Analytical chemistry

2 Sissejuhatus

Läbi ajaloo on inimesed kasutanud end ümbritsevas keskkonnas leiduvaid looduslikke materjale (nagu vaike, õlisid, vahasid, rasvu, värvaineid, proteiine, suhkruid, mineraale jne) väga erinevatel eesmärkidel, näiteks ehituses, tööriistade ja relvade valmistamisel, meditsiinis, kunstis jne. Seetõttu esineb neid materjale tihti ajaloolistes objektides ja arheoloogilistes leidudes.

Ajalooliste objektide valmistamiseks kasutatud materjalide uurimisel ja analüüsimisel on võimalik koguda informatsiooni nende koostise kohta, mis omakorda võib anda vihjeid antud objektide valmistamismeetodi ja –aja, päritolu, kasutamise jms kohta. Täiendavalt ajaloolisele informatsioonile on teadmised materjali koostise kohta olulised ka kultuuriväärtuslike objektide konserveerimisel ja restaureerimisel. Omades infot koostise kohta, on võimalik valida autentsemaid materjale objektide konserveerimiseks/restaureerimiseks. Tundes vananemise käigus toimuvaid muutusi, on võimalik paremini ennustada, kuidas neid protsesse aeglustada või pidurdada. Kokkuvõttes, tundes materjali on võimalik seda paremini kaitsta ja taastada.

Enamjaolt on aga looduslike materjalide analüüsimine keeruline, sest need koosnevad tihtipeale paljudest erinevatest komponentidest. Eriti kompleksse koostisega on orgaanilised ühendid, mida iseloomustab kõrge arv koostisosi, mis tihtipeale on väga sarnase ehituse ja/või brutovalemiga. Lisaks sõltub looduslike materjalide koostis nende bioloogilisest päritolust, töötlemisprotsessidest (kuumutamine, destilleerimine), vananemise tingimustest (niiskus, temperatuuri kõikumised, valgus jms) ja kestusest. Seetõttu pole jätkuvalt suudetud lõplikult kirjeldada paljude looduslike materjalide koostist ja vananemisprotsesside käigus toimuvaid muutusi (nii keemilisi kui füüsilisi). Ajalooliste objektide puhul on tihti probleemiks ka väga väike proovi kogus. Looduslike materjalide analüüsimiseks kasutatavad instrumentaalmeetodid peavad seega olema tundlikud, et oleks võimalik töötada väikeste proovikogustega ning kõrge lahutusvõime ja täpsusega, et teha vahet väga sarnastel komponentidel.

Tänapäeval on üheks võimekamaks analüütiliseks instrumendiks Fourier' teisendusega ioonsüklotronresonants massispektromeeter (FT-ICR-MS) ning paindlikumaks eraldusmeetodiks kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC). FT-ICR-MS-i kõrge resolutsiooni ja massitäpsuse tõttu on selle abil võimalik vähendada potentsiaalsete ühele m/z väärtusele vastavate brutovalemite hulka ja seega lihtsustada komponentide tuvastamist.

Lisaks on antud meetod ka väga tundlik. HPLC suureks eeliseks on võimalus töötada minimaalse proovi ettevalmistusega (piisab proovi lahustamisest ja filtreerimisest), pakkudes siiski efektiivset kromatograafilist lahutust.

Kuigi FT-ICR-MS pakub head resolutsiooni, siis looduslike orgaaniliste materjalide massispektrites on tihtipeale niivõrd palju piike, et need võivad siiski hakata kattuma. Samuti ei ole kõrgresolutsiooniga massispektromeetria abil võimalik teha vahet sama brutovalemiga ühenditel. See omakorda teeb massispektri interpreteerimise keeruliseks. FT-ICR-MS-i ühendamine HPLC-ga muudab massispektrite interpreteerimise lihtsamaks ja suurendab seeläbi analüüsimise käigus koostise kohta saadava informatsiooni kvaliteeti.

Käesoleva töö eesmärgiks on kombineerida TÜ Keemia instituudis olevad *Agilent 1260 Infinity* HPLC ja *Varian 910* FT-ICR-MS instrumendid ühtseks süsteemiks, mille abil analüüsida orgaanilisi looduslikke materjale. Kahest instrumendist ühtse süsteemi loomiseks oli vaja lahendada järgmised ülesanded:

- 1) instrumentide füüsiline ühendamine - vedelikuvoolu suunamine HPLC-st massispektromeetrisse;
- 2) FT-ICR-MS-i m/z täpsuse tõstmiseks kasutatavate sisekalibrantide lisamine süsteemi;
- 3) massispektri registreerimise kiiruse suurendamine, et registreerida massispektreid kromatogrammi jaoks piisava sagedusega.

Töö käigus oli vajalik välja selgitada proovide analüüsiks sobivad kromatograafilised, ioniseerimise ja massispektromeetrilised parameetrid ning leida sobivad sisekalibrandid (ka sobiva kontsentratsiooniga) FT-ICR-MS-i jaoks.

Süsteemi katsetamiseks ja parendamiseks kasutati kahte tüüpi mudelproove: kampolvaiku ja männitõrva kui vees mittelahustuvate proovide esindajaid ning punaseid värvaineid (kermes) kui vees lahustuvaid materjale. Välja töötatud süsteemi võimekust ja praktilisust testiti ka reaalse ajaloolise proovi peal - vaiguline proov 16. sajandist pärit laevavrakilt Nargen1.

3 Kirjanduse ülevaade

3.1 Looduslikku päritolu orgaanilised materjalid ning nende analüüsimise eripärad

Looduslikud materjalid nagu vaigud, õlid, rasvad, värvained jne on enamjaolt keerulise ja mitmekesise koostisega ühendid. Üldiselt on orgaaniliste ainete koostis, vananemise ja lagunemise käigus toimuvad muutused keerukamad kui anorgaaniliste ainete puhul, mistõttu on nende analüüsimine ja uurimine suurem probleem. On tavaline, et looduslikud orgaanilised ühendid koosnevad paljudest sarnase koostisega komponentidest (tihtipeale omavad sama brutovalemist), mis aja jooksul võivad polümeriseeruda, oksüdeeruda, metüleeruda, kombineeruda teiste omataoliste ühenditega jne. Käesolevas töös arendatava HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi testimiseks looduslike orgaaniliste materjalide analüüsimiseks valiti kahte tüüpi mudelproovid. Vees mittelahustuvate proovide esindajatena kasutati kampolvaiku ja männitõrva (vaigulised materjalid) ja vees lahustuvate proovide esindajana punast värvainet kermest (looduslikud värvained).

3.1.1 Looduslike vaikude analüüsimine

Vaigud on kõrge viskoossusega vees mittelahustuvad kleepuvad vedelikud. Enamus looduslikke vaike on puuvaigud, kuid leidub ka üksikuid loomseid vaike (nt lakitäide toodetud šellakvaik). Puuvaikude koostis on keeruline ja need sisaldavad mitmeid erinevaid tüüpi ühendeid. Enamjaolt koosnevad vaigud terpenoididest (keemilise modifikatsiooni läbinud terpeenidest). Terpeenid ja seega ka terpenoidid on looduses laialt levinud ühendite klass, kus ühendid võib lugeda formaalselt koosnevaks isopreeni molekulidest (C_5H_8). Terpenoide saab jaotada klassidesse vastavalt sellele, mitmest isopreeni molekulist terpenoid koosneb. Näiteks on eeterlikud õlid monoterpenoidsed (koosnevad kahest isopreeni ühikust), vaigud on di- ja triterpenoidsed (vastavalt neli ja kuus isopreeni ühikut), karoteenide ja karotenoidide puhul on tegemist tetraterpeenide ja terpenoididega (aluseks kaheksa isopreeni ühikut) jne. [1,2]

Looduslikke vaike on kasutatud pinnakatete ja liimainetena juba kiviajast saati. Hüdrofoobsete omaduste ja läbipaistvuse tõttu sobivad vaigud hästi ka kunstiobjektide katmiseks ja kaitsmiseks. Seetõttu on vaike kasutatud palju lakkide koostises, nii maali-, puidu- kui ka metallilakkide tootmisel. Läbi ajaloo on üks väga oluline vaigusaadus olnud ka tõrv, mida saadakse vaigulise puidu või vaigu destruktiivsel destilleerimisel. Pürolüüsi käigus

tekivad väiksema molekulmassiga ühendid, näiteks kaotavad vaigu algsed komponendid metüül- ja karboksüülrühmi. Tõrva keetmisel toimub ka aromatiseerumine. Tõrva on kasutatud (ja kasutatakse siiani) materjalide tihendamiseks, veekindluse tõstmiseks ja liimina. [1,3]

Põhja-Euroopas on enim levinud vaiguks kampilvaik, mida saadakse männivaigu kuumutamisel (eraldub lisaks ka tärpentin) [1]. Kampilvaik koosneb enamasti diterpenoididest ning selle põhikomponent on abietiinhape, lisaks sisaldab see veel hulganisti erinevaid vaikhappeid (põhikomponendid ja nende struktuurid on toodud lisas 1). Kampoli erinevad komponendid on omaduste ja struktuuri poolest sarnased, lisaks toimub juba üsna lühikese aja jooksul komponentide isomeriseerumine, oksüdeerumine, polümeriseerumine jne. Tagajärjena on komponentide üksteisest eraldamine ja analüüsimine küllaltki keerukas. Vananemise ja erinevate töötlusprotsesside tagajärjel muutub kampoli koostis veelgi keerulisemaks, mis esitab analüüsimeetodile kõrged nõudmised. [1–5]

Nagu eespool mainitud, on vaigulised materjalid hüdrofoobsed, mistõttu sobivad nende lahustamiseks üldiselt vaid orgaanilised lahendid. Samuti tuleb arvestada sellega, et vaigulised materjalid sisaldavad tihti peale polümeerset fraktsiooni ning olemasolev proovikogus võib olla väga väike (mõned kümned nanogramm). See seab piirangud ka analüüsimeetodi valikule – on vaja kõrge tundlikkuse ja hea resolutsiooniga instrumenti.

3.1.2 Looduslike värvainete analüüsimine

Värvained on orgaanilised ühendid, mida kasutatakse esemetele (tekstiilidele, tintidele ja kosmeetika saadustele) värvi andmiseks. Looduslikud värvained saadakse taimedest või putukatest ekstraheerimise teel ning peamiselt on need punase, kollase, pruuni või sinise värvusega. [1,6] Värvained saavad oma värvi tänu nende koostisses kuuluvatele aromaatsetele komponentidele. Neile on iseloomulik, et intensiivse värvuse saavutab juba väikese koguse värvandva komponendi puhul. Antud töös kasutatakse mudelproovina punast värvainet kermest, sest see on üks olulisemaid värvained. [7]

Looduslikud punased värvained (nii taime- kui putukapõhised) koosnevad enamasti kinoonidest, täpsemalt antra- ja naftokinooni derivaatidest (põhistruktuurid on toodud lisas 2). Nagu ülalpool mainitud, siis antud töös kasutatakse kermest. Kermest saadakse emastest *Kermes vermilio* putukatest ning see oli enne Ameerika avastamist Euroopas enimlevinud putukatest saadav värvaine. [1]

Värvainete analüüsimise muudab keeruliseks nende materjalide suur komponentide arv, kusjuures, nagu ülalpool mainitud, siis värviandva komponendi kontsentratsioon selles segus võib olla väga madal. Lisaks mõjutavad värvainete uuringuid ka nendega toimuvad lagunemisprotsessid. Ajalooliste ja kultuuriväärtuslike proovide korral on taaskord probleemiks ka väga väike proovi kogus. [8]

3.2 Keerukate looduslike proovide analüüsimine

Looduslike materjale, sealhulgas vaike ja värvaineid on analüüsitud suure hulga erinevate meetoditega. Nii näiteks on tuvastamiseks edukalt kasutatud infrapuna (IR) ja Raman spektroskoopiat. Lisaks on IR spektroskoopia abil uuritud ka vaikude vananemist (vananemisel toimuvaid muutusi) ja bioloogilist päritolu. [9,10] Mainitud spektroskoopiliste meetodite abil pole aga võimalik määrata proovide keemilist koostist ega lagunemisprodukte.

Vaikude analüüsimiseks on palju kasutatud ka gaasikromatograafiat (GC), suuresti kombinatsioonis massispektromeetriaga, mis võimaldab saada informatsiooni analüüsitavate materjalide koostise kohta. Kuna GC-ga analüüsimiseks peab proovid viima gaasifaasi, nõuab see aga küllaltki keerulist proovi ettevalmistust (üldjuhul eeldab derivatiseerimist), mis võib olla aeganõudev protsess ja suurendab oluliselt proovi kulu. Lisaks on paljud ajaloolistelt ja kultuuriväärtuslikelt objektidelt võetud vaigulisi materjale sisaldavad proovid suurel määral polümeriseerunud, mille tõttu pole võimalik enamust proovist GC-ga analüüsida. [3,6,11,12] HPLC-d on kasutatud nii vaikude kui ka värvainete analüüsiks. Viimaste puhul on HPLC üks populaarsemaid analüüsimeetodeid. Kuna enamik looduslike värvaineid on polaarsed, siis kasutatakse pöördfaaskromatograafiat. Detektoritest on kasutusel nii UV-Vis, fluorestsents kui ka MS detektor. Kasutades vedelikkromatograafiat on suudetud identifitseerida mitmeid erinevaid värvaineid (nt kermes, košinell, indigo jms) tekstiilides, tintides jms. [6,8,12–15]

Vaikude analüüsiks on HPLC-d kasutatud vähem, kuna komponentide lahutamine kipub olema keeruline – vaikude lahustamiseks sobivad solventid ei kipu kattuma antud meetodile sobilike solventidega. Eelisteks on aga minimaalne proovi ettevalmistus võrreldes gaasikromatograafiaga ning võimalus viia analüüsi läbi toatemperatuuri juures, mis hoiab ära vaikhapete isomeriseerumise. Põhiliselt on HPLC-d kasutatud vaikhapete identifitseerimiseks erinevates proovitüüpides. [16,17]

Keerukate looduslike proovide analüüsimiseks on kasutatud ka MS-i eraldiseisva instrumendina (*direct MS method*). [3] Kuna komponentide arv sellistes materjalides on aga

väga suur ning need sisaldavad palju sama nominaalmassiga molekule, kipuvad piigid neis massispektrites kattuma. Materjalide vananemise tõttu võib juhtuda, et mõni komponent laguneb ja selle molekulmass hakkab kattuma mõne teise komponendi molekulmassiga. Sellises olukorras pole võimalik ainult massispektri põhjal nendel ainetel või koostiskomponentidel vahet teha.

3.3 HPLC ja FT-ICR-MS instrumentide ühendamise

Kombineerides kromatograafia, siinkohal HPLC ja kõrgresolutsiooniga massispektromeetria on võimalik analüüsimiseks registreerida massispektreid, mida toetavad antud materjali kromatogrammid. Seega on võimalik analüüsida massispektreid, kus on korraga vähem informatsiooni ning tänu kromatografeerimisele on võimalus vahet teha sama brutovalemiga komponentidel.

HPLC-FT-ICR-MS süsteeme on kasutatud ka varasemalt. Selliste süsteemide keerukuse tõttu on need leidnud rakendust vaid eriti nõudlike analüütiliste probleemide korral. Kõige enam on seda süsteemi kasutatud proteoomika vallas ja veel näiteks ka pestitsiidi uurimisel. Süsteemi on kasutatud ka näiteks pärmi trüpsiini-hüdrolüsaadi uurimiseks, kus tuvastati umbes 110 000 erinevat komponenti. [18–23]

Kirjanduses on kirjeldatud ka probleeme seoses HPLC ja FT-ICR-MS ühendamisega (sisekalibrantide lisamine, MS mõõtmiste ajakulu vähendamine). Küll aga pole tihti kirjeldatud, kuidas neid probleeme lahendada. Lisaks on välja töötatud lahendusi enamasti võimatu otse üle võtta, kuna FT-ICR-MS instrumentide ehitus on väga varieeruv (tihtipeale individuaalne). Seetõttu tuleb lahendused kohapeal välja töötada.

Järgnevalt on kirjeldatud antud süsteemi erinevaid osasid ja nende tööpõhimõtteid.

3.3.1 HPLC tööpõhimõte ja omadused

Kromatograafia on meetod komponentide eraldamiseks segudes. Eraldumine põhineb komponentide erineval jaotumisel mobiilse ja statsionaarse faasi vahel. Olemas on mitmeid erinevaid kromatograafia liike, antud töös vaadeldakse vedelikkromatograafiat.

Vedelikkromatograafia puhul on mobiilseks faasiks vedelik (eluent). Statsionaarse faasina kasutatakse mõne-mikromeetrise diameetriga osakesi. [24] Need materjalid on pakitud kolonni, millest pumbatakse kõrge rõhu (kuni umbes 400 bar [25]) all läbi mobiilset faasi. Proovilahus süstitakse mobiilsesse faasi, mis kannab analüüsitavad ained läbi kolonni.

Kolonnist väljudes liiguvad analüüsitavad ained detektorisse. Mida enam on analüüsitavate ainete jaotustasakaal nihutatud statsionaarse faasi poole, seda aeglasemalt need kolonni läbivad. Vastavalt jaotuskoefitsientidele liiguvad erinevad analüüdid läbi kolonni erineva kiirusega ja jõuavad detektorisse erinevatel ajahetkedel.

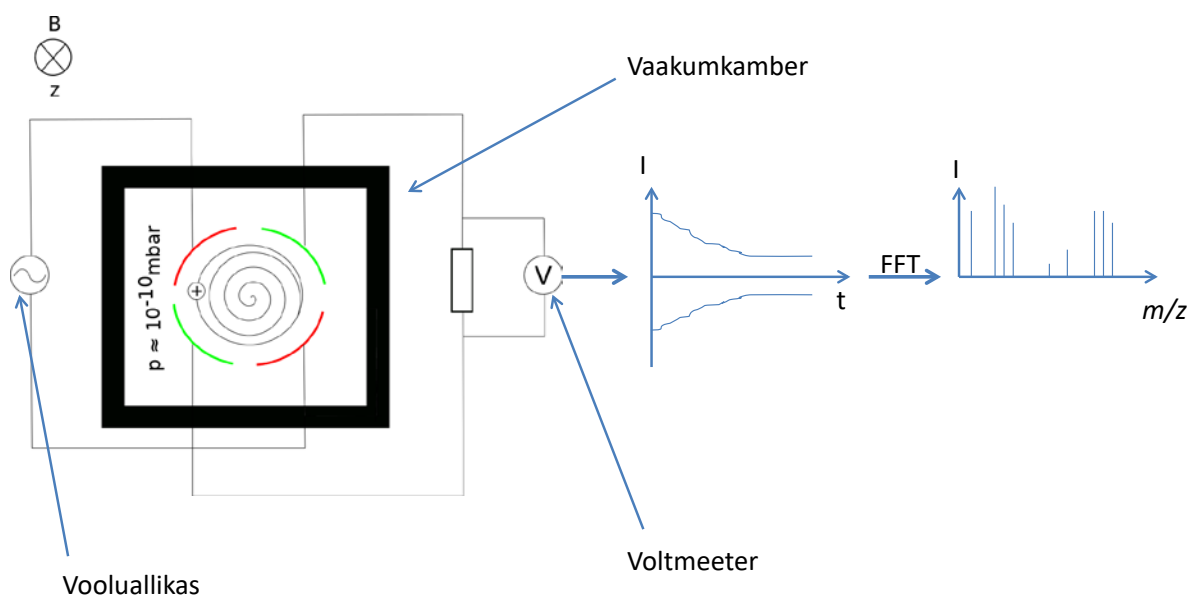
Vedelikkromatograafia jaguneb normaalfaas- ja pöördfaaskromatograafiaks. Normaalfaaskromatograafias on statsionaarne faas polaarne (tänu silikageelist kolonnitäidisele või selle pinnale kinnitatud amino-, tsüano- või dioolrühmadele) ning mobiilne faas mittepolaarne (orgaanilised lahendid näiteks heksaan, kloroform, benseen). Pöördfaaskromatograafias on vastupidi – polaarne mobiilne faas koosneb veest ja mõnest orgaanilisest lahendist (peamiselt metanool või atsetonitriil) ning statsionaarne faas on mittepolaarne tänu erineva pikkusega süsivesinikahelatega töödeldud täidisele (enamjaolt C18 ahelad). Seega sõltub see, millist liiki vedelikkromatograafiat kasutada analüüsitavate ainete polaarsusest: normaalfaaskromatograafia sobib ennekõike mittepolaarsete ainete ja pöördfaaskromatograafia peamiselt polaarsete ainete analüüsimiseks. Kuna paljud looduslikud materjalid on polaarsed, siis kasutatakse enamjaolt pöördfaaskromatograafiat. [24]

HPLC üks suurimaid eeliseid on selektiivsus. Kuna analüüsi käigus segu komponendid eraldatakse üksteisest, on võimalik analüüsitavaid aineid detekteerida üksikhaaval. HPLC-s on kasutusel mitmeid erinevaid detektoreid ning sellest tulenevalt võivad HPLC instrumentide omadused tugevalt varieeruda. Detektorist oleneb suurel määral kogu meetodi tundlikkus, täpsus ning võimekus analüüte identifitseerida. Enimlevinud detektoriks HPLC puhul on analüüdi UV-Vis spektriala neelduvuse mõõtmisel põhinev detektor. Kuna paljud orgaanilised molekulid neelavad UV-Vis alas, on see detektor küllaltki väheselektiivne. Juhul kui on tegemist dioddrivi tüüpi detektoriga, on võimalik mõõta analüütide spektreid, mis suurendab meetodi selektiivsust. Suurema selektiivsusega on ka fluorestsentsdetektor ja massispektromeeter, kusjuures viimane võimaldab kompenseerida ka kattuvaid kromatograafilisi piike. [21–23]

3.3.2 FT-ICR-MS tööpõhimõte ja omadused

Fourier' teisendusega ioon-tsüklotron-resonants massispektromeetris (FT-ICR-MS, vt skeemi joonisel 1) viiakse ioonid esmalt ICR mõõterakku, kuhu on tekitatud kõrgvaakum (10^{-10} mbar). Mõõterakk asub ülijuhtmagneti poolt tekitatud magnetväljas. Sisenedes magnetvälja hakkavad ioonid liikuma ringorbiidil. Rakus olevaid ioone ergastatakse elektromagnetvälja

impulsiga, mille sagedus vastab ionide tsüklotronsagedusele. Ergastamise tagajärjel suureneb ionide tsüklotronliikumise orbiidi raadius. Juhul kui mõõteraksus asuks vaid üksioon, oleks tsüklotronliikumise sagedus vaid iooni m/z väärtusest ning magnetinduksioonist. Mõõtes tsüklotronliikumise sagedust on seega võimalik määrata iooni m/z väärtus. Reaalsuses mõõdetakse korraga signaali suurelt hulgalt ionidelt. Mõõteraku külgedel asuvad vastakuti kaks omavahel elektriliselt ühendatud mõõteplaati, millest ioonid ringorbiidil liikudes perioodiliselt mööduvad. Mõõteplaadist möödudes mõjutab ionide elektriväli mõõteplaadi vabu elektrone. Olenevalt ionide laengu märgist ionid kas tõmbavad vabu elektrone lähemale või tõukavad eemale. Elektronide liikumine tekitab mõõteplaate ühendavas juhtmes elektrivoolu. Registreerides voolu muutuse ajas ning rakendades saadud andmetele Fourier' teisendust, saadakse ionide ringliikumise sagedusspekter, mis omakorda on teisendatav massispektriks.



Joonis 1: FT-ICR-MS põhimõtteskeem. Rohelisega on kujutatud detektorplaadid, punasega ergastusplaadid.

Teoreetiliselt oleks iooni tsüklotronsagedus ainult iooni m/z väärtusest ning magnetinduksioonist. Reaalsuses mõjutavad tsüklotronsagedust veel ionide endi elektriväli, ioone raku lõksustava pinge elektriväli, magnetvälja ebahomogeensus jms. Nende efektide arvestamiseks kasutatakse mõõtmiste m/z täpsuse tõstmiseks sisekalibreerimist. Proovilahusele lisatakse sisekalibrandid: hästi ioniseeruvad ühendid, mille molekulmass on täpselt teada. Võrreldes omavahel sisekalibrantide mõõdetud m/z väärtust tegeliku m/z

väärtusega, on võimalik võtta arvesse eelnimetatud efektide poolt tekitatud ebatäpsusi ning saada täpsemaid m/z tulemusi.

FT-ICR-MS on väga võimas analüüsiinstrument. Rutiinsetel tingimustel on tüüpiliseks resolutsiooniks 100 000 ja m/z täpsus alla 2 ppm-i. Ideaaljuhul võib resolutsioon ulatuda kuni mitmetesse sadadesse tuhandetesse ning m/z täpsus jääda suurusjärku 1 ppm. FT-ICR-MS on ülimalt kõrge tundlikkusega instrument, millega on võimalik ideaalsetes tingimustes registreerida vaid umbes kümne iooni signaali [27]. Seega, analüüsitava aine kogus võib olla väga väike. Nende omaduste tõttu võib eeldada, et FT-ICR-MS on sobiv instrument antud töös uuritavate looduslike materjalide uurimiseks.

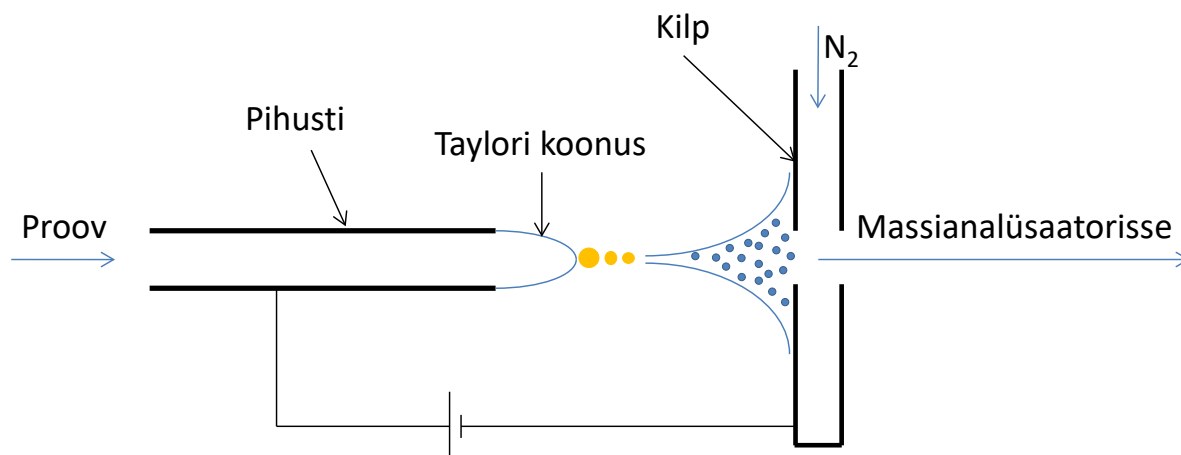
Nagu eelpool selgitatud, on selliste materjalide koostis keeruline – komponentide arv on suur ja tihtipeale on need lisaks ka väga sarnase struktuuriga. Seega väiksema lahutusvõimekuse või m/z täpsusega instrumentide puhul ei ole võimalik usaldusväärselt määrata selliste materjalide komponentide elementset koostist: erinevate komponentide nominaalsed m/z väärtused hakkaksid massispektrites kattuma. Samuti on tähtis antud instrumendi suur tundlikkus, kuna väljatöötatava meetodi üheks rakenduseks on ajalooliste ja kultuuriväärtuslike proovide analüüsimine, mis tähendab, et kättesaadavad proovikogused on tihti väga väikesed (kuni mõned kümned nanogrammid).

3.3.3 Elektropihustus ionisatsiooniallikas

Selleks, et ühendada HPLC ja FT-ICR-MS (või mõni muu MS instrument) on vajalik vedelikkromatograafist väljuvad ning endiselt vedelikus asuvad analüüsitavad ained viia gaasifaasi ja ionsesse vormi. Selleks kasutatakse ionisatsiooniallikaid.

Käesolevas töös kasutati ionisatsiooniallikana elektropihustust (edaspidi ESI – *electrospray ionization*), täpsemalt nano-ESI (nESI) allikat. ESI allikas liigub proovilahus läbi mõnesaja mikromeetrise läbimõõduga metallkapillaari, mille otsa ja massianalüsaatorisse viiva ava ees asuva metallplaadi vahele rakendatakse mõne kilovoldine pinge. Seetõttu tekib kapillaari ning metallplaadi vahel tugev elektriväli (10^6 V/m), mille tulemusel pihustub proovilahus (vedelikkromatograafist tulev eluent) kapillaari otsast avause poole. Mõnikord kasutatakse parema pihustuse saamiseks ka pihustusgaasi, mis voolab eluendiga koaksiaalselt ning aitab tekitada pisemaid tilkasid. Pihusti ja ava vahekaugus on mõni millimeeter kuni mõni sentimeeter sõltuvalt sellest kui kiiresti solvent aurustub. Pihustamisel tekivad laetud tilgad, mis liiguvad läbi kuuma (100...300 °C) inertgaasi (tüüpiliselt lämmastik) voolu. Gaasivoolus solvent aurustub ning tilga suurus väheneb kuni elektriväli selle pinnal muutub liiga suureks.

Tilk laguneb nn kulonilise lõhenemise tagajärjel üha väiksemateks tilkadeks kuni tilgast jäävad alles vaid gaasifaasis ioonid. Viimased liiguvad elektrivälja toimetel läbi avause massianalüsaatorisse. [28,29] ESI allika üldine skeem ja tööpõhimõte on toodud joonisel 2.



Joonis 2: nESI ionisatsioonallika skeem. Kollasega kujutatud vedeliku tilgad, sinisega gaasifaasis ioonid.

ESI allikas, sh ka nESI allikas sobib tööpõhimõtte poolest hästi HPLC-ga ühendamiseks ja võimaldab töötada termiliselt ebastabiilsete ühenditega. ESI allikas ja HPLC sobivad hästi kokku, sest mõlemad töötavad pidevalt voolava vedelikujoaga ning voolukiirused mõlemas seadmes on sarnased (nESI allika puhul mõningate modifikatsioonidega) [28].

nESI allikas töötab ESI allikaga sarnaselt, kuid tollel on mitmeid omadusi, mis muudavad selle antud töö jaoks sobilikuks. nESI allika kapillaari diameeter on võrreldes tavalise ESI-ga väiksem, tüüpiliselt mõni mikromeeter. Väiksemast kapillaarist pihustades tekivad väiksemad tilgad ning aurustatava solvendi hulk on samuti seeläbi väiksem. Solvendi aurustamine saab seetõttu toimuda kiiremini. Nii saab kapillaari otsa asetada massispektromeetri avausele lähemale, mis läbi väheneb avausest mööda lendavate ionide hulk ning seetõttu on nESI allikas veelgi tundlikum kui tavaline ESI. Väiksemate voolukiiruste tõttu ei vaja nESI allikas ka pihustusgaasi. [29] Kuna antud töö üheks eesmärgiks on rakendada väljatöötavat süsteemi ajalooliste proovide analüüsiks, mille puhul tuleb arvestada väga väikeste proovi kogustega, siis annab nESI allikas siinkohal eelise, sest see sobib paremini töötamiseks just selliste proovi kogustega. nESI-ga on võimalik töötada lahustega, milles analüüdi kontsentratsioon jääb vahemikku 10^{-3} ... 10^{-7} M. Seega võimaldab nESI allikas analüüsida proove, kus analüüsitava materjali sisaldus on ülimalt madal.

4 Eksperimentaalne osa

4.1 HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi osade kirjeldus

Süsteem koosneb HPLC ja FT-ICR-MS (kombineeritud QQQ MS-iga) instrumendist, mille ühendamiseks koostati töö raames voolusüsteem. Voolusüsteem koosneb kahest voolujagajast, mille eesmärk on vähendada HPLC-st massispektromeetrisse sisestatava lahuse hulka. Süsteemi on ühendatud ka pump sisekalibrantide lahuse lisamiseks massispektromeetrisse.

Kokku pandud süsteemi testimiseks kasutati mitut tüüpi looduslikke proove: vaigulisi proove (ennekõike kampolvaiku) kui vees mittelahustuvate materjalide esindajaid ning värvaineid kui vees lahustuvate materjalide näiteid. Enamus katsetusi viidi läbi kampolvaiguga, värvaineid analüüsiti põgusalt veendumaks, et koostatud süsteem sobib ka nende analüüsimiseks. Töö käigus ei analüüsitud süvitsi kasutatud materjalide koostist, nende peamine eesmärk oli näidata, et kokku pandud süsteem töötab ja sobib selliste materjalide analüüsimiseks.

4.1.1 HPLC seade

Töös kasutati ultraviolet-nähtava kiirguse (UV-Vis) detektoriga vedelikkromatograafi *Agilent 1260 Infinity*.

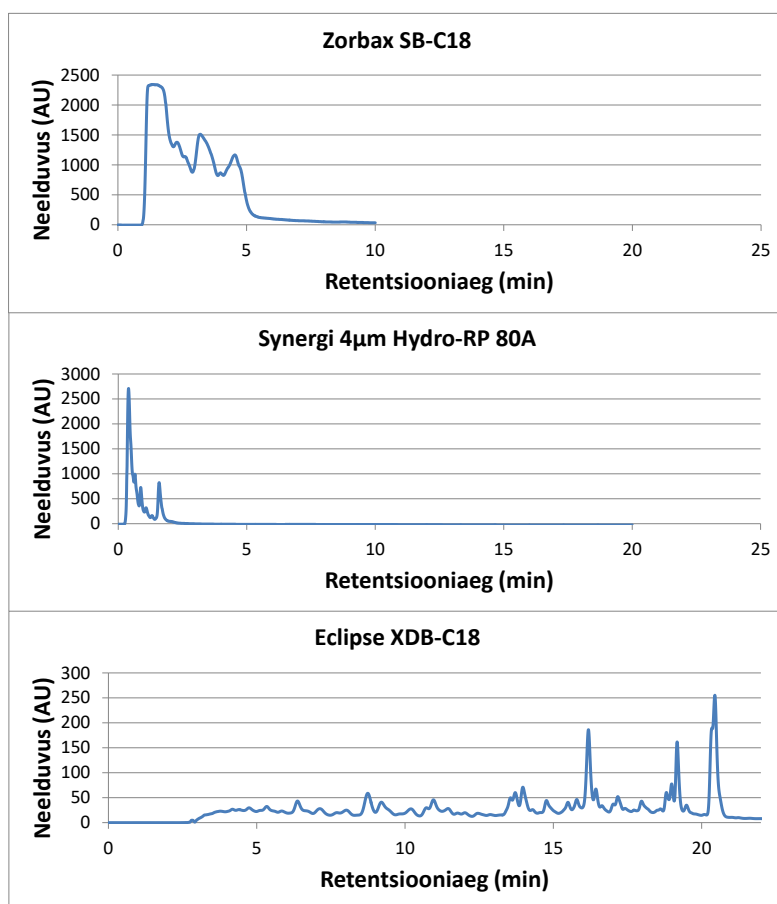
HPLC meetodi arendust alustati kolonni valikust. Vaiguliste materjalide analüüsimiseks prooviti kolme kolonni: *Agilent Eclipse XDB-C18*, *Phenomenex Synergi 4 µm Hydro-RP 80A* ja *Agilent Zorbax SB-C18*. Testitud kolonnide parameetrid on toodud tabelis 1.

Tabel 1. Katsetatud HPLC kolonnide parameetrid

Kolonn	<i>Zorbax SB-C18</i>	<i>Synergi 4µm Hydro-RP 80A</i>	<i>Eclipse XDB-C18</i>
Parameeter			
Kolonni täidis	C18	C18 polaarsete deaktiveerivate rühmadega (polar endcapping)*	C18
Mõõtmed (läbimõõt x pikkus)	2,1 x 50 mm	4,6 x 250	4,6 x 250 mm
Täidisosakeste suurus	1,8 µm	4 µm	5 µm

* Kolonni täidise töötlemisel vahetatakse silanoolrühmad välja C18 ahelatega. Antud kolonni puhul on järele jäänud silanoolrühmad asendatud polaarsete funktsionaalrühmadega.

Nagu eelpool mainitud, siis üldjuhul sisaldavad looduslikud orgaanilised materjalid väga palju komponente, mis tihtipeale on sarnaste omadustega. Seetõttu oli ootuspärane, et kromatogrammil esinevad erinevate komponentide piigid võivad paikneda lähestikku, mistõttu võivad need kattuda. Nagu näha jooniselt 3 oli samadel elueerimise tingimustel (Tabel 2, kampolvaik) kõige paremini võimalik kampolvaigu koostisosi lahutada *Eclipse XDB-C18* kolonniga, mistõttu tööd jätkati selle kolonniga. Seega valiti edasisteks katsetusteks just *Eclipse XDB-C18* kolonn. Sama kolonniga tehti edasisi katseid ka värvaineid sisaldavate proovidega.



Joonis 3: Testitud kolme kolonni kromatogrammid, mis on saadud kampolvaigu kromatografeerimisel

Töös kasutatud erinevat tüüpi materjalide analüüsimise jaoks kasutati individuaalseid kromatografeerimise programme (vt tabel 2). HPLC programme optimeeriti senikaua kuni saavutatud lahutust loeti piisavaks, et testida LC-MS süsteemi.

Erinevate looduslike proovide analüüsimiseks HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga kasutati nii gradientelueerimist kui ka isokraatilist elueerimist. Mobiilne faas oli kahekomponentne:

- komponent A: 0,1% (v/v) sipelghappe (Sigma-Aldrich) lahus deioniseeritud vees ning
- komponent B: metanool (MeOH, Sigma-Aldrich).

Alguses katsetati metanooli asemel ka atsetonitriili (Sigma-Aldrich), kuid pihustuse stabiilsus nESI allikas oli metanooliga märkimisväärselt parem, mistõttu jätkati edasisi katseid metanooliga.

Tabel 2. Erinevat tüüpi proovide elueerimiseks kasutatud programmide ülevaade

Proov	Kampolvaik		Vaigulised proovid		Värvained	
Gradient	Aeg	Koostis	Aeg	Koostis	Aeg	Koostis
	0-5 min	70% B	0-15 min	85/90/100% B	0-10 min	90-100% B
	5-15 min	70-100% B				
	15-25 min	100% B				
Voolukiirus	0,8 ml/min					
Süsti ruumala	5 µl		1...5 µl		10 µl	
Detekteeritavad lainepikkused	210 nm; 230 nm; 250 nm; 254 nm; 280 nm		210 nm; 230 nm; 250 nm; 254 nm; 280 nm		430 nm; 450 nm; 500 nm; 550 nm; 600 nm;	

Nagu näha tabelist 2, siis kampolvaigu puhul kasutati gradientelueerimist. Mobiilse faasi alguse koostiseks valiti 70% MeOH, et tagada võimalikult hea kromatograafiline lahutus ja piisavalt pikad retentsiooniajad komponentidele. Madalama MeOH sisalduse puhul ei oleks kampolvaik enam mobiilses faasis täielikult lahustunud. Reaalsete vaiguliste proovide puhul oli võimalik kasutada veel väiksema vee sisaldusega eluenti, kuna antud proovides toimus sadenemine juba proovilahusele väikse veekoguse lisamisel (tilk). Sellest tulenevalt kasutati reaalsete vaiguliste proovide puhul eluenti vee sisaldusega 0...15% olenevalt proovi vees lahustuvusest.

Värvainete kromatografeerimiseks kasutati tabelis 2 näidatud kromatograafilist programmi.

HPLC meetodite seadistamise ajal kasutati voolukiirust 1,0 ml/min, kuid ühendades süsteemi nESI allikasse oli vaja üle minna voolukiirusele 0,8 ml/min, kuna suurema voolukiiruse puhul ei olnud võimalik saavutada stabiilset pihustust nESI allikas.

Süsti ruumala oli kampoli puhul 5 µl. Värvainete ja reaalsete proovide puhul varieerus süsti ruumala ühest kuni kahekümne mikrolitriini olenevalt saadud ekstrakti (umbkaudsest) kontsentratsioonist.

4.1.2 FT-ICR-MS

Massidetektorina kasutati *Varian 910* FT-ICR massispektromeetrit kombineerituna *Varian J320-MS* kolmekordse kvadрупooliga massispektromeetriga (QQQ) koos *Variani* nESI allikaga. Tabel 3 annab ülevaate antud töös kasutatud nESI allika parameetritest. Allika parameetrid valiti vastavalt eluendi koostisele: suurema pindpinevusega vedelikud vajavad stabiilse pihustuse jaoks suuremat pinget pihusti ja kilbi vahel. Samuti varieeriti kuivatusgaasi temperatuuri olenevalt kui kergesti eluent aurustus.

Tabel 3. Nano-ESI allika parameetrid

Parameeter	Väärtus
Pinge pihustil	1900...2400 V
Pinge kilbil	25...100 V
Kuivatusgaasi rõhk	1 bar
Kuivatusgaasi temp	200...300 °C
Pihusti nõelte välisdiameeter	0,2 mm

Kasutatud FT-ICR-MS parameetrid on toodud tabelis 4.

Tabel 4. FT-ICR-MS parameetrid

Parameeter	Väärtus
Magnetinduktsioon	7 T
Ergastava impulsi amplituud (b-p)	100 V
Ioonjuhi raadiosagedusliku pinge amplituud (b-p)	180 V
Registreeritav m/z vahemik	108...1000
Jahutussüsteem	Vedela heeliumi ja lämmastiku põhine
Mõõtorežiim	Positiivne

4.1.3 HPLC ja FT-ICR-MS instrumentide ühendamine

HPLC ja FT-ICR-MS ühendamiseks kasutati polüeeter-eeter ketoonist (PEEK) kapillaare sisediameetriga 120 μm . Vedeliku voolu jagamiseks kasutati voolujagajat *QuickSplitTM Adjustable Flow Splitter*.

4.2 Proovide ettevalmistamine ja analüüsiparameetrid

4.2.1 Proovide lahused

Süsteemi testimiseks kasutati erinevat tüüpi proove: kampolvaiku ja männitõrva kui vett sisaldavas solvendis halvasti lahustuvate analüütide esindajaid ja värvaineid kui (kõrge)

veesisaldusega solventides lahustuvate analüütide esindajaid. Väljatöötatud süsteemi rakendati ka reaalse vaigulise proovi analüüsimiseks – 16. sajandist pärit laeva vraki lastist (Nargen 1) leitud vaiguline materjal.

Kampoli lahused valmistati metanoolis, ligikaudse kontsentratsiooniga 1 mg/ml. Männitõrva lahus valmistati metanoolis kontsentratsiooniga 8,5 mg/ml. Nargen 1 proov lahustati metanoolis, lahuse kontsentratsioon oli 30 mg/ml.

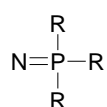
Värvainete kromatograafilise programmi välja töötamiseks valmistati lahus puhaste sünteesitud komponentidega: alisariin (*Reakhim*) (4 µg/ml), karmiinhape (*Reakhim*) (4,2 µg/ml) ja purpuriin (*Sigma-Aldrich*) (4,5 µg/ml). Lahustina kasutati metanooli ja vee segu suhtega 2:1.

Kermese proovi valmistamiseks leotati värvi lähteainet (putukad) vees pea ööpäev ning kuumutati mõned tunnid 80 °C juures. Saadud ekstrakt filtreeriti.

Enne proovide süstimist vedelikkromatograafi filtreeriti kõik lahused läbi *Whatman® Puradisc 13* PVDF-ist membraanfiltrit (pöör suurus 0,45 µm).

4.2.2 Sisekalibrandid ja nende lisamine eluendivoolule

Et tagada võimalikult kõrge m/z täpsus lisati kõigile analüüsitavate proovide jooksudele ka sisekalibrante, mis võimaldavad massispektrite m/z telgesid individuaalselt kalibreerida. Massispektrite m/z telgede kalibreerimiseks kasutati erinevaid fosfaseenide soolaid. Fosfaseenid on joonisel 4 kujutatud fragmenti sisaldavad ühendid.



Joonis 4: Fosfaseeni struktuurühik

Fosfaseenid on ühed tugevamad orgaanilised alused. Kuna fosfaseenid ioniseerivad kergesti on neid hõlbus kasutada FT-ICR-MS-is sisekalibrantidena positiivses režiimis. [30] Tabelis 5 on toodud m/z telgede kalibreerimiseks kasutatud fosfaseeniumioonide arvutatud m/z väärtused ja vastavate katioonide kontsentratsioon eluendivoolule lisatavas kalibrantide lahuses. Lahused on valmistatud metanoolis. (Lisas 3 on toodud kasutatud fosfaseeniumioonide struktuurid).

Tabel 5. Registreeritud HPLC-nESI-FT-ICR-MS massispektrite m/z telje kalibreerimiseks kasutatud fosfaseeniumkatioonide ioonvalemid, täpsed (arvutatud) m/z väärtused ja kontsentratsioonid eluendivoolule lisatavas lahuses

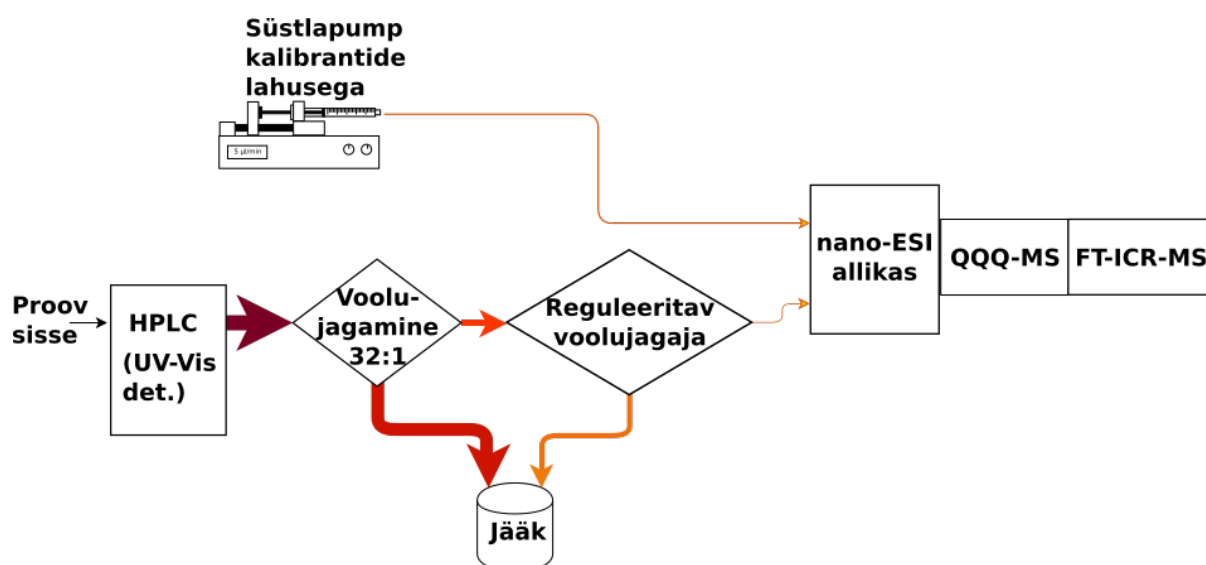
Brutovalem (protoneeritud)	Iooni täpne m/z	Kontsentratsioon lahuses ($\mu\text{mol/l}$)
$\text{C}_9\text{H}_{25}\text{N}_3\text{P}^+$	206.17806	1,36
$\text{C}_{14}\text{H}_{40}\text{N}_7\text{P}_2^+$	368.28149	0,06
$\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{N}_7\text{ClP}_2^+$	552.28947	0,03
$\text{C}_{26}\text{H}_{64}\text{N}_{13}\text{P}_4^+$	682.43526	0,02
$\text{C}_{44}\text{H}_{82}\text{N}_{13}\text{P}_4^+$	916.57611	0,07

Sisekalibrantide lisamiseks eluendivoolule kasutati süstlapumpa *GEMINI 88 Plus Dual Rate Syringe Pump*. Sisekalibrantide infuseerimiskiirus oli 2 kuni 10 $\mu\text{l/min}$. Infuseerimiskiirust muudeti vastavalt analüütide signaali intensiivsusele: kui analüütide signaal oli liiga nõrk ja kalibrantide oma oli sellest tugevalt üle, vähendati infuseerimiskiirust ja vastupidi, tõsteti kui kalibrantide signaal oli liiga nõrk.

5 Tulemused ja arutelu

5.1 HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi üldine kirjeldus

Antud töö käigus välja töötatud analüüsisüsteem koosneb neljast osast: vedelikkromatograaf, kolmekordse kvadрупooliga massispektromeeter (QQQ-MS), FT-ICR-MS ja instrumente ühendav voolusüsteem. Joonis 5 annab kokku pandud analüüsisüsteemist ülevaate.



Joonis 5. HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi diagramm, noole paksus ja tumedus illustreerib voolukiirust vastavas kapillaaris

Nagu jooniselt 5 näha, siis süstitakse proovilahus süsteemi vedelikkromatograafi kaudu, kus see liigub läbi HPLC kolonni ja UV-Vis detektori. Pärast kromatografeerimist läbib proovilahus koos eluendiga voolusüsteemi ja siseneb nESI allikasse. Viimases vabanetakse solvendist ja tekitatakse gaasifaasis ioonid, mis liigutatakse läbi QQQ-MS-i FT-ICR-MS osasse. Süsteemis on ka lisaharu, mis algab sisekalibrantide lahuse sisestamiseks mõeldud süstlapumbast ning jookseb prooviga paralleelselt nESI allikasse.

Selleks et muuta HPLC-st tulev eluendivool sobilikuks nESI allika jaoks on voolusüsteemis kaks voolu jagavat punkti. Esimene neist on fikseeritud jaotusega (vahekorras 32:1) ja teine on reguleeritava jaotusega. Voolujagamispunktide eesmärk on suunata enamus vedelikkromatograafist tulevast vedelikust jääkidesse, kuna nESI allikas ei ole võimeline töötama nii suure voolukiiruse juures kui vedelikkromatograaf. Kromatograafilise jooksu käigus muutub süsteemis nii rõhk kui ka eluendi koostis. Seetõttu muutub ka nESI pihustuse

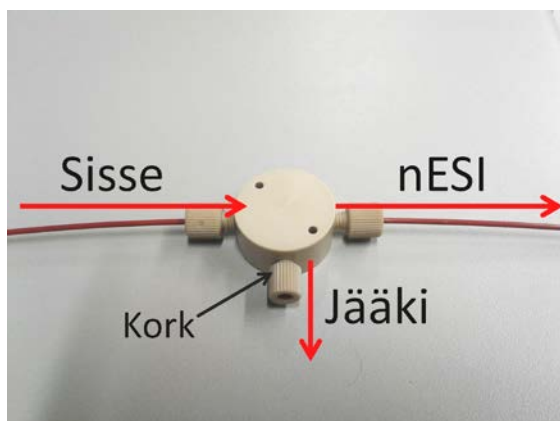
stabiilsus. Erineva pindpinevusega ained vajavad ESI allikas stabiilse pihustuse jaoks erineva tugevusega pingeid pihusti ja kilbi vahel. Võrrand 1 näitab, kuidas sõltub minimaalne pinge, mille juures tekib stabiilne pihustus, ionisatsiooniallika parameetritest.

$$V_0 = A_1 \left[\frac{2Tr_C \cos \theta_0}{\epsilon_0} \right]^{0,5} \ln(4h/r_C) \quad [31]$$

Võrrand 1: Stabiilse pihustuse jaoks vajaliku minimaalse pinge (lävendpinge) sõltuvus ionisatsiooniallika parameetritest, V_0 -lävendpinge, A_1 -empiiriline konstant, T -pindpinevus, r_C -kapillaari raadius, θ_0 -pool Taylori koonuse tipunurgast, ϵ_0 -elektriline konstant, h -kapillaari ja kilbi vaheline kaugus

Samuti vajavad erineva lenduvusega ained erinevaid kuivatusgaasi temperatuure. Kuna kromatograafilise jooksu ajal on keeruline muuta ESI allikas pihusti ja kilbi vahelist pinget ning kuivatusgaasi temperatuuri jooksvalt, siis reguleeritav voolujaotuspunkt ongi vajalik selleks, et neid muutusi kompenseerida. Kui eluendi koostis muutub näiteks nii, et stabiilse pihustuse jaoks oleks vaja suuremaid pingeid või kõrgemat kuivatusgaasi temperatuuri, on võimalik hoopis vähendada voolukiirust nESI allikas.

Reguleeritav voolujaotur koosneb T-kujulise kanaliga ühendustükist (Joonis 6), kus on üks sisendharu ning kaks väljundharu. Üks väljundharudest jookseb nESI allikasse ning teine on suletud keeratava korgiga. Reguleerides kuivõrd tihedalt kork kinni on keeratud, on võimalik muuta nESI allikasse mineva vedeliku hulka ja seega ka pihustuse stabiilsust. Kui kork on täielikult kinni keeratud liigub kogu vedeliku vool nESI allikasse, kui kork on täiesti lahti, liigub peaaegu kogu vool allikast mööda. Reguleerides korki nende kahe asendi vahel on võimalik valida, kui suur proportsioon vedelikujoast nESI allikasse suunatakse.

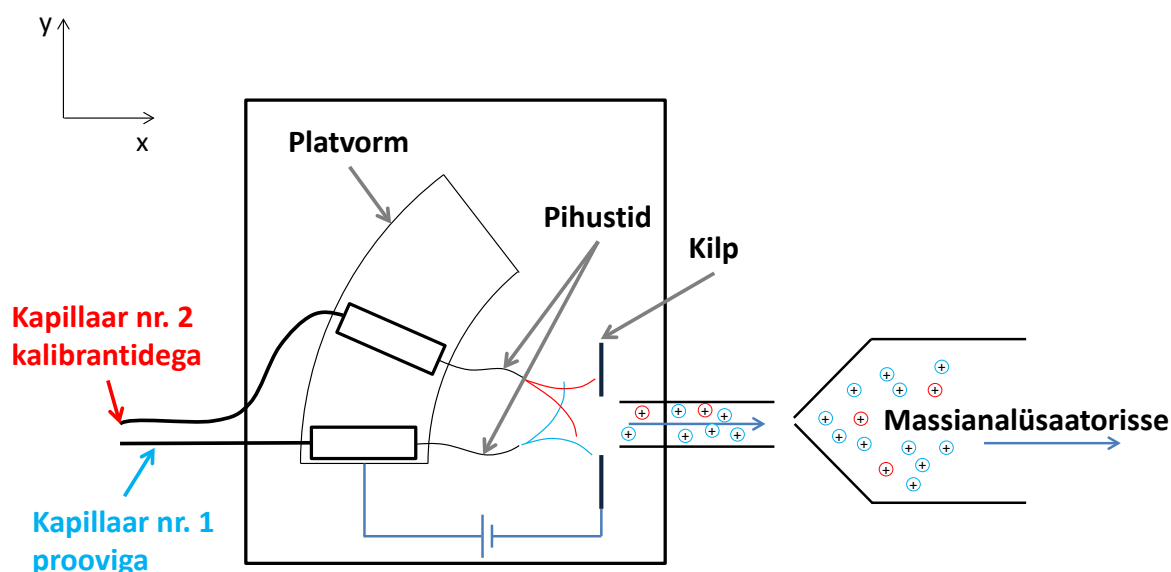


Joonis 6: T-kujuline voolujaotur

5.2 Nano-ESI allika modifitseerimine sisekalibrantide lisamiseks

FT-ICR-MS instrumendi kaasamisel proovide analüüsimisse on tavaliselt vajalik lisada proovilahustele sisekalibrante, et saavutada suurem m/z täpsus. Antud analüüsisüsteemi puhul on aga oluline, et kalibrandid saaks süsteemi lisatud pärast vedelikromatograafia osa, et tagada nende pidev olemasolu massispektrites.

Joonisel 7 on näha käesolevas töös kasutatud nESI allika skeem. Esmalt prooviti lisada kapillaarile nr 1 (Joonis 7, sinise kirjaga) lisaharu, mille kaudu oleks massispektromeetrisse liikuvale vedelikule juurde pumbatud sisekalibrantide lahust (vt skeemi lisas 4).

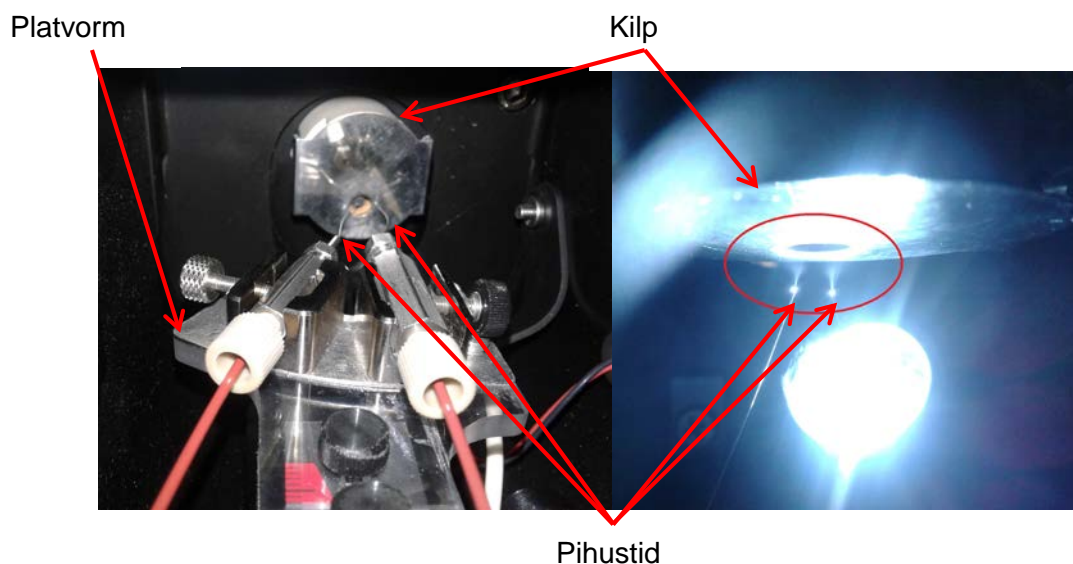


Joonis 7. Diagramm nESI allikast pealt vaates

Algselt proovitud lahendus (lisas 4 toodud skeemile vastav) osutus aga probleemseks. Kromatograafilise joosku käigus muutub pidevalt süsteemi rõhk, seetõttu oleks vaja pidevalt reguleerida ka sisekalibrantide lahuse pumpamise kiirust, et kompenseerida rõhu muutusi. Vastasel juhul muutuks ajaühikus süsteemi voolava sisekalibrantide lahuse hulk kontrollimatult. Näiteks tekkis antud lahenduse puhul olukordi, kus süsteemi rõhk muutus piisavalt suureks ja proovilahus hakkas seetõttu voolama mitte massispektromeetrisse, vaid sisekalibrantide lahusega süstlasse. Sellises süsteemis on aga süstlapump koos süstlaga nõrk lüli, kuna see ei pruugi vastu pidada süsteemis esinevatele kõrgetele rõhkudele.

Sisekalibrantide infuseerimisega seotud probleemide lahendamiseks täiustati olemasolevat nESI allikat. Allikale lisati tavapärase ühe nõela kõrvale veel teine pihustusnõel (Joonis 7,

punase kirjaga). Selline kahe nõelaga allikas võimaldab massispektromeetrisse infuseerida paralleelselt mitut erinevat lahust selliselt, et ühes harus voolava vedeliku kiirus (ja seeläbi ka rõhk) ei mõjuta teises harus voolavat vedelikku. Nii on võimalik ühest nõelast sisestada proovilahust ning teisest infuseerida sisekalibrantide lahust ja hoida need kaks lahust eraldatuna seni, kuni need segunevad nESI allikasse pihustades. Antud töö käigus modifitseeritud nESI allika kahe nõela süsteem on näha joonisel 7 toodud fotodel.



Joonis 8: Vasakpoolne foto on tehtud allika seest suunaga massianalüsaatori poole, parempoolne foto on tehtud pealt vaates, massianalüsaator jääb fotol üles suunas. Punase ovaali sees on näha avaust, mis viib massianalüsaatorisse, kahte pihustit ja nende ottest tulevat kahte pihustatud juga

Seoses sisekalibrantide süsteemi infuseerimisega on vaja ka silmas pidada, et kuna analüütide signaal kromatograafilise lahutuse tõttu pidevalt kasvab ja kahaneb ning kuna sisekalibrantide signaal võrreldes analüütide signaaliga võiks olla ligikaudu 40%, siis võiks analüüsi käigus muutuda ka sisekalibrantide signaali intensiivsus. Platvorm, millele pihustid on nESI allikas kinnitatud, on liigutatav y-telje sihis (Joonis 7 ja joonis 8 vasakpoolne foto). Platvormi y-telje sihis liigutades on võimalik reguleerida pihustite otste kaugust massispektromeetrisse viivast avausest ja seega ka pihustist massispektromeetrisse jõudvate ioonide hulka. Ühte pihustit lähemale liigutades liigub teine pihusti kaugemale ning seeläbi on võimalik reguleerida proovi ja kalibrantide omavahelist suhtelist intensiivsust massispektris.

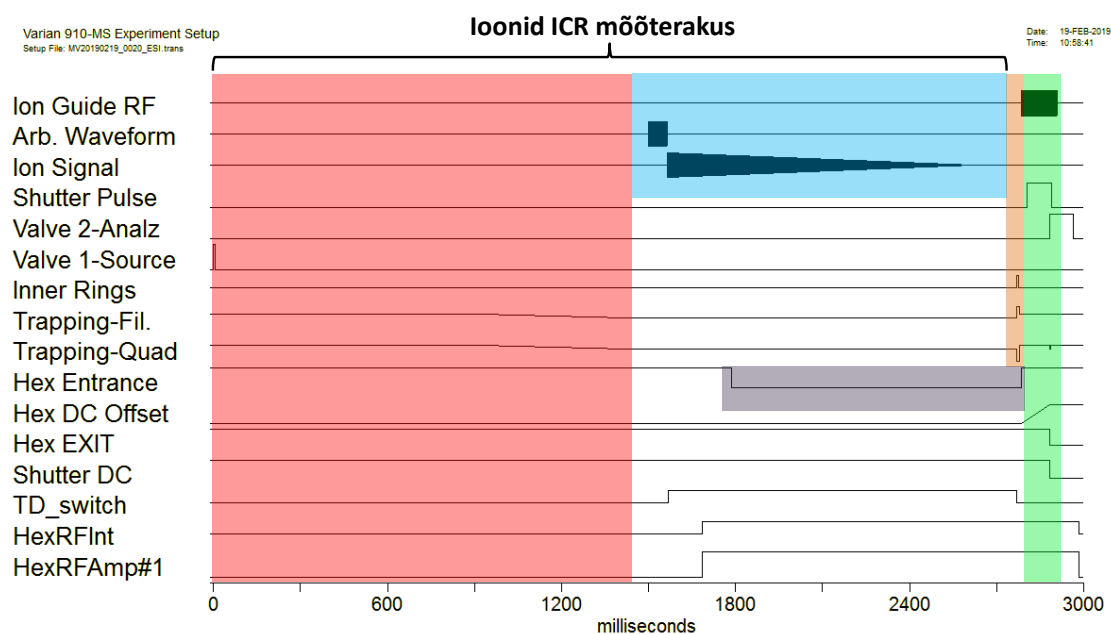
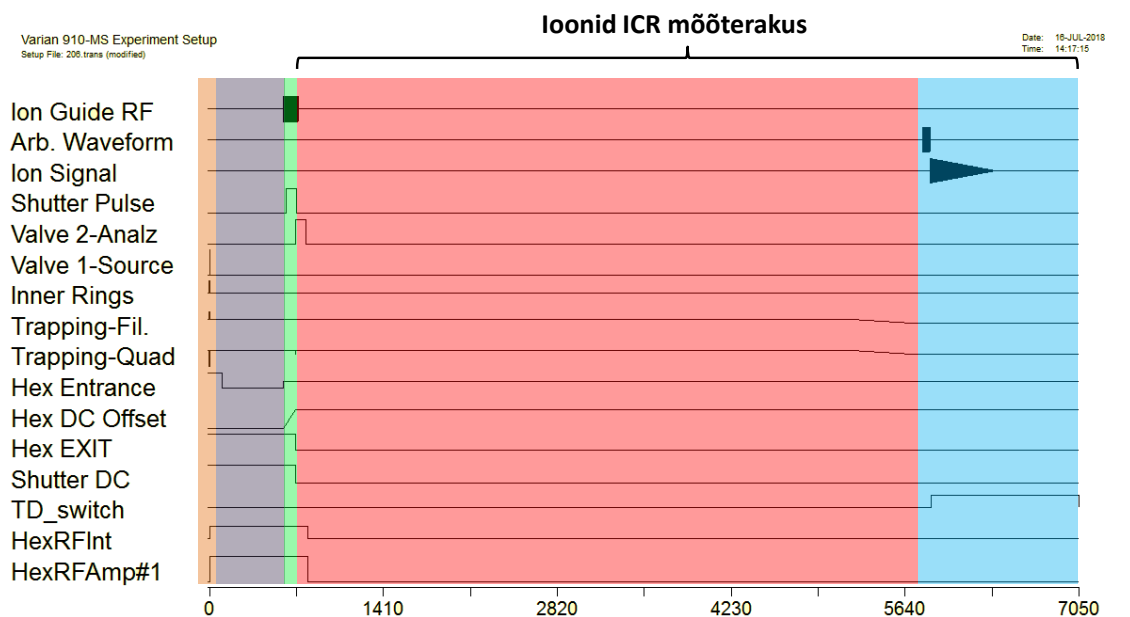
Modifitseeritud nESI allika tööle saamiseks oli vaja optimeerida pihustite asendit allikas. Jooniselt 7 on näha, et pihustid on painutatud. Pihustite painutamine oli vajalik, et mõlema pihusti pihustused oleks suunatud massispektromeetrisse. Sirgete pihustite puhul paikneksid

nende otsad üksteisele liialt lähedal. Sellisel juhul tekib efekt, kus pihustused justkui tõukaksid üksteist eemale: pihustused ei ole enam suunatud massianalüsaatori poole vaid sellest mööda, lahuseid pihustatakse vaid vastu kilpi ja tekkinud ioonid ei läbiks avaust, mis viib massianalüsaatorisse. Seega, et tekkinud ioonid massianalüsaatorisse jõuaks, oli vaja viia pihustite otsad üksteisest kaugemale. Leiti, et pihustused ei kaldu algselt suunalt kõrvale juhul kui pihustite otste vahekaugus on enam kui 3 mm. Ainult siis jõuavad ioonid mõlemast pihustist massianalüsaatorisse.

Pihustite kaugus kilbist oleneb ka solvendist. Kõrgema pindpinevusega solventid vajavad stabiilse pihustuse jaoks suuremaid elektrivälja tugevusi ja peaks seega olema kilbile lähemal. Töö käigus leiti, et juhul kui solventid erinevates pihustites on märkimisväärselt erineva pindpinevusega (kõrge veesisaldusega HPLC-st tulev vool vs metanoolis lahustatud kalibrantide vool) ja vajavad stabiilse pihustuse jaoks erineva tugevusega elektrivälju, on võimalik paigutada pihustid kilbist erinevale kaugusele ja seeläbi saavutada stabiilne pihustus mõlemast pihustist korraga.

5.3 FT-ICR massispektri registreerimise kiirendamine

Üheks oluliseks etapiks antud analüüsisüsteemi kokku panemisel oli FT-ICR-MS parameetrite modifitseerimine selliselt, et massispektrite salvestusaeg oleks piisavalt lühike kromatografeerimise jaoks. Ühe FT-ICR massispektri mõõtmine (ioonide registreerimine ja massispektri kuvamine) võtab aega umbes 16 sekundit, sellest umbes 7 sekundit kulub massispektri registreerimiseks (mõõteprogramm) ja ülejäänud aeg kulub andmetöötluseks (Joonis 9, ülemine osa). HPLC ühendamisel FT-ICR-MS-ga on see aeg liialt pikk, kuna võib juhtuda, et mõnest kitsamast kromatograafilisest piigist jääb seetõttu massispekter registreerimata. Lisaks pole nESI/tavalist ESIioonallikat kasutades pihustus täielikult stabiilne - aeg-ajalt Tayloriga koonus lõhkeb (vt joonis 2), mistõttu pihustus hetkeks kaob. Kui sellisel hetkel kogutakse massispektri registreerimiseks ioone, siis registreeritakse nn „tühi spekter“, sest sellisel juhul jõuab massispektromeetrisse vaid tühisel hulgal ioone. Arvestades massispektri registreerimisele kuluvat aega ning aeg-ajalt esinevaid tühje spektreid, on vajalik suurendada ajaühikus registreeritavate spektrite arvu.



- a) ICR mõõteraku tühjendamine
- d) Ioonide liikumise aeglustumine
- b) Ioonide kogumine heksapooli
- e) Ioonide ergastamine ja spektri registreerimine
- c) Ioonide ülekanne heksapoolist ICR mõõterakku

Joonis 9. Tüüpilise (üleväl) ja HPLC-ga ühendamise tarbeks modifitseeritud (all) ESI-FT-ICR-MS mõõteprogrammi võrdlus; x-teljel on aeg (ms), iga horisontaalne joon kujutab ühe masina elemendi pinget - joone tõusmisele vastab pinge suurenemine

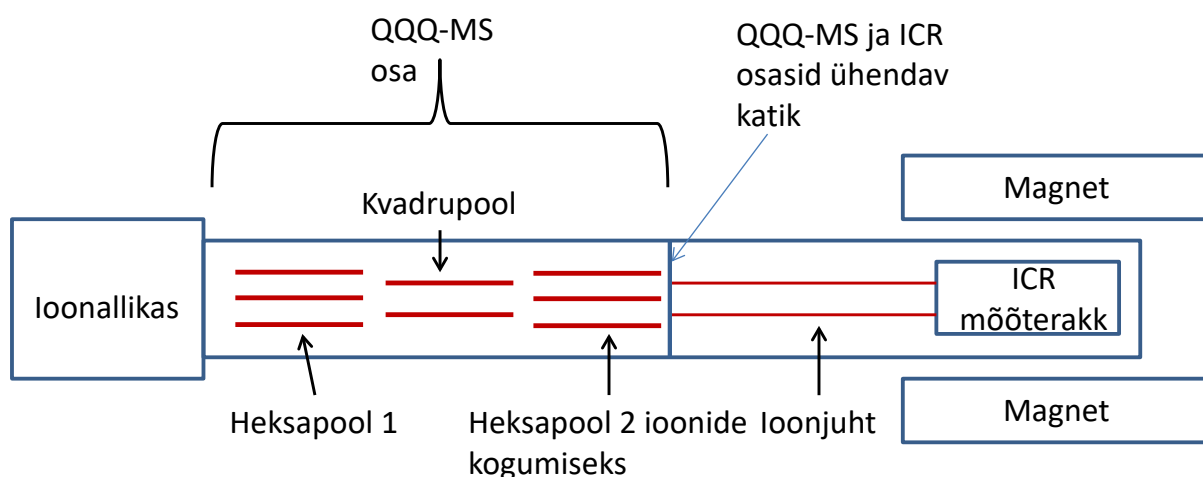
Massispektri kogumisele kuluva aja lühendamiseks on kolm võimalust. Esiteks on võimalik panna mõned spektri kogumise etapid toimuma paralleelselt (impulssjärjestuse muutmise) ning teiseks on võimalik vähendada aega, mille jooksul ioonid enne ergastamist ICR mõõterakus viibivad (impulssjärjestuse lühendamine). Kolmandaks peab valima optimaalsed

andmetöötlusparameetrid. Järgnevalt on toodud ülevaade, kuidas neile kolmele aspektile läheneti.

5.3.1 Impulssjärjestuse ümber programmeerimine

Ühe FT-ICR massispektri registreerimine (vaata joonis 10) koosneb viiest etapist:

- ICR mõõteraku tühjendamine ionidest;
- ioonide kogumine heksapooli 2;
- ioonide ülekanne heksapoolist 2 ICR mõõterakkuioonjuhi kaudu;
- ioonide liikumise aeglustamine;
- ioonide ergastamine ja spektri registreerimine.



Joonis 10: Ioonide liikumise (lihtsustatud) teekond läbi QQQ massianalüsaatori ja ioonoptika ICR mõõterakku. Joonis on esitatud läbilõikena

Enne ICR mõõterakku ülekandmist kogutakse portsjon ioone masina QQQ-MS osas asuvasse heksapooli 2. Kogutud ioonid saab ICR mõõterakku üle kanda ühe korraga. See võimaldab mõõterakku enamiku ajast ülejäänud süsteemist eraldatuna hoida ning seeläbi rakus madalama rõhu saavutada. Selleks et vähendada analüüsiaega on võimalik ühe spektri registreerimise ajal alustada juba järgmiste ionide kogumist heksapooli 2. Sellisel juhul oleks ühe massispektromeetrilise mõõtmise ajaline kulg järgnev:

- ioonide liikumise aeglustamine;
- ioonide ergastamine ja spektri registreerimine ICR rakus, samaaegne uue portsjoni ionide kogumine heksapooli 2;
- ICR mõõteraku tühjendamine;

d) ioonide ülekanne heksapoolist 2 ICR mõõterakku.

Loodigi modifitseeritud mõõteprogramm, mille ajaline kulg vastaks eelkirjeldatule. Modifitseeritud mõõteprogrammi keskseks sündmuseks valiti hetk, kus ioonid lõksustatakse mõõterakku. Enamiku teiste sündmuste toimumishetked on defineeritud teiste selle sündmusega seotud sündmuste suhtes (väljavõtted mõõteprogrammidest on toodud lisas 5). Nii on võimalik mõõteprogrammi vajadusel modifitseerida minimaalse vaevaga. Erinevate proovide puhul võib vaja minna erinevaid instrumendi seadeid: lõksustuspinged, ioonide kogumisaeg, FT-ICR-MS signaali kogumisaeg jne. Kirjeldatud programmi ülesehituse puhul enamasti piisab vaid ühe sündmuse toimumishetke muutmisest: teised sellega seotud sündmused liiguvad automaatselt kaasa.

Sellisel modifitseeritud mõõteprogrammiga on võimalik ühe massispektri kohta aega kokku hoida umbes 0,5...1 sekundit ehk umbes 10% tüüpilisest mõõteprogrammi ajast.

Modifitseeritud mõõteprogrammi eeliseks on ka mõõteprogrammi pikkuse sõltumatus ioonide kogumisaegast. Kui signaal on nõrk, siis on võimalik seda tugevdada kogudes ioone kauem heksapooli 2 ning saades seeläbi mõõtmiseks rohkem ioone. Modifitseeritud mõõteprogrammi abil on võimalik kogumisaega pikendada ilma mõõteprogrammi kogu kestust pikendamata.

5.3.2 Impulssjärjestuse lühendamine

Teine koht, kus on võimalik massispektri registreerimiseks kuluvat aega kokku hoida on lühendada ajavahemikku ioonide mõõterakku sisenemise ja tsüklotronliikumise ergastamise vahel. Ioonid sisestatakse mõõterakku magnetvälja sihiliselt ning nende liikumist selles sihis piiratakse elektriväljadega: ioonid jäävad z-telje (vt joonis 1) sihis võnkuma. Z-telje-sihiline võnkumine mõjutab ioonide tsüklotronsagedust ning seetõttu lastakse mõõterakku väike kogus gaasi, et ioonide võnkumist pidurdada [32]. Mida aeglasem on ioonide liikumine z-telje sihis, seda väiksemat lõksutuspinget on võimalik kasutada. Ioonide magnetronsagedus on võrdeliselt lõksutuspingest. Mida väiksem on magnetronsagedus seda väiksem on erinevus mõõdetava sageduse ja iooni tsüklotronsageduse vahel [29]. Ioonide jahutamine on vajalik ka selleks, et ioonparv asuks võimalikult mõõteraku keskel, sest ainult seal on iooni tsüklotronsagedus sõltumatu iooni asukohast mõõterakus [33]. Seega, vähendades aega, mille jooksul ioone ICR-rakus jahutatakse, peaks vähesel määral vähenema instrumendi lahutusvõime ning massitäpsus. Samas, massispektri interpreteerimine aga seetõttu keerulisemaks ei muutu, kuna kasutades massispektromeetrit koos HPLC-ga esineb ühes

spektris kordades vähem komponente kui analüüsitavaid lahuseid otse massispektromeetrisse infuseerides ning mõnevõrra madalam resolutsioon komponentide identifitseerimist ei sega, sest oht, et piigid hakkavad kattuma alaneb. Samas aga väheneb märkimisväärselt mõõtmiste ajakulu, kuna tüüpilisest ICR massispektri registreerimisest pikima osa moodustab just ioonide liikumise pidurdamine (jahutamine) mõõterakus (joonis 9, ülemine osa). Rakendades antud lahendust on võimalik aega kokku hoida kuni umbes 5 sekundit ehk kuni 70% tüüpilisest mõõteprogrammi ajast. Seejuures ei täheldatud märgatavat langust massitäpsuses ega ka resolutsioonis. Seega, FT-ICR-MS parameetrite modifitseerimise tulemusel saavutati märkimisväärne ajavõit (5 sek) ja seeläbi suurendati oluliselt HPLC-nESI-FT-ICR-MS analüüsi käigus registreeritavate massispektrite arvu.

5.3.3 Optimaalsete andmetöötlusparameetrite valimine

Tüüpilise FT-ICR massispektri registreerimisel kulub andmetöötlusele umbes 9 sekundit ehk üle poole ühe massispektri registreerimise jaoks kuluvast ajast. Valides andmetöötluse jaoks õiged parameetrid on võimalik seda aega umbes poole võrra lühendada, seega, andmete töötlemisel on optimaalsete parameetrite valimine kriitilise tähtsusega. Järgnevalt on kirjeldatud kolme aspekti, mille modifitseerimisel on võimalik andmetöötlusel aega kokku hoida.

Enne kui kogutud andmeid arvutis töötlemaks hakatakse, konverteeritakse registreeritud signaal digitaalsele kujule. See protsess toimub transiendi digitaliseerijas (*Transient digitizer*, TD). TD-s on kahetuumaline protsessor. Seadme tarkvaras on võimalik valida, kas kasutatakse esimest või teist tuuma või mõlemaid paralleelselt. Vaikimisi on valitud vaid ühe tuuma kasutamine. Aja kokkuhoidmiseks tuleb valida variant, kus mõlemat tuuma kasutatakse paralleelselt. Aja kokkuhoid sellise valiku tegemisel oleneb spektri registreerimise parameetritest, kuid tüüpiliste andmete kogumise aja ja diskreetimissageduse (ADC) puhul võib nii säästa umbes 3 sekundit.

Andmetöötlusele kuluv aeg on otseselt seotud andmepunktide hulgaga: mida rohkem on andmepunkte seda rohkem aega kulub nende töötlemiseks. Seetõttu peaks massispektri registreerimisel püüdma registreerida madalaima võimaliku arvu andmepunkte, mis veel ei sega andmete interpreteerimist. Üks võimalus selleks on lühendada signaali registreerimise aega. Küll aga tuleb silmas pidada, et FT-ICR-MS puhul oleneb resolutsioon otseselt signaali registreerimise ajast, mistõttu tuleb arvestada, et kui lühendada aega väheneb ka resolutsioon. Kõrge resolutsioon on aga FT-ICR-MS juures üks suurimaid eeliseid. Seega, peab leidma

optimaalsed tingimused ning valima registreerimise aja madalaima resolutsiooni järgi, millega on veel võimalik töötada.

Veel üks võimalus ajakulu vähendada on valida madalam diskreetimissagedus (*ADC rate*) ehk sagedus, millega kogutakse andmepunkte signaali digitaliseerimisel. Kui valida madalam diskreetimissagedus ei ole enam võimalik registreerida nii suure sagedusega signaale kui kõrgema diskreetimissagedusega. Seeläbi pole kõrgemate sagedusega signaalide puhul enam täidetud Nyquist-Shannoni teoreem: signaali täiuslik rekonstrueerimine on võimalik vaid siis, kui diskreetimissagedus on vähemalt kaks korda suurem mõõdetava signaali sagedusest. [26] See tähendab, et ioonidel on olemas mingi maksimaalne sagedus, millest kõrgemat registreerida ei saa. Kuna iooni tsüklotronsagedus ja selle m/z väärtus on pöördvõrdeliselt seotud, järeldub, et on mingi minimaalne m/z väärtus, millest madalamatelt väärtustelt signaali ei saada. Langetades diskreetimissagedust tõstetakse seega seda alumist m/z piiri. Diskreetimissageduse valimisel tuleks seega jälgida, milline on madalaim m/z väärtus, mida tahetakse registreerida ning lähtuda sellest antud sageduse valimisel.

Kõiki eelnevalt kirjeldatud meetmeid rakendades suudeti ühe massispektri registreerimise ajakulu vähendada 16 sekundi pealt 4 sekundi peale, säilitades siiski spektrite kvaliteedi. Uue mõõteprogrammi abil saavutati umbes sekundiline ajavõit. Optimaalset ionide jahutamisaega kasutades säästeti umbes 5 sekundit. Valides optimaalsed andmetöötlusparameetrid säästeti umbes 6 sekundit.

Antud tulemus kehtib käesolevas töös kasutatud proovide puhul. Konkreetne ajakulu oleneb spetsiifilisest analüüsitavast materjalist ja seega võib varieeruda. Erinevate proovide puhul võib olla vajalik kasutada erinevaid heksapooli 2 kogumisaegu, diskreetimissagedusi, FT-ICR-MS signaali kogumisaegu jms, mistõttu erineb ka ajakulu.

5.4 HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi rakendamine proovide analüüsimiseks

Välja töötatud HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi testimiseks kasutati peamiselt vaiguliste materjalide proove. Analüüsiti kampilvaiku, männitõrva, 16. sajandi laevavrakilt leitud vaigulise materjali proovi. Lisaks testiti süsteemi põgusalt ka looduslike värvainete analüüsimiseks.

Järgnevalt on esitatud põhilised tähelepanekud andmete töötlemise kohta ning lisatud on nii vaiguliste materjalide kui värvainete analüüsimisel HPLC-nESI-FT-ICR-MS-iga saadud üldised tulemused. Põhjalik massispektri piikide omistamine kindlatele ühenditele ei olnud käesoleva töö eesmärgiks, kuid esmased interpreteerimisandmed on toodud lisades. Lisaks on töö käigus analüüsitud materjalide HPLC-nESI-FT-ICR-MS andmed kättesaadavad veebilehel: <https://analytical.chem.ut.ee/databases/hrms/>.

5.4.1 Andmete töötlemise alused

Iga kromatograafilise jooksu käigus salvestati mitusada massispektrit, näiteks 20 minuti pikkuse kromatograafilise jooksu kohta 313 massispektrit. Kõigi ühe jooksu käigus salvestatud massispektrite interpreteerimine on seega väga ajamahukas töö. Aja säästmiseks on seetõttu otstarbekas vähendada interpreteeritavate spektrite hulka. Selleks mõistlik viis on otsida igale UV-Vis-kromatogrammis olevale piigile vastav massispekter, mis sobib kõige paremini interpreteerimiseks.

Massispektri sobivust interpreteerimiseks saab hinnata a) spektri summaarse (üldise) intensiivsuse, b) kalibrantide massispektris olemasolu ja c) kalibrantide ning analüütide omavahelise suhtelise intensiivsuse järgi. Kuna pihustus ei olnud kasutatud nESI ionisatsioonallika korral päris stabiilne võib erinevatest pihustitest tulevate ainete signaal kõikuda ja aeg-ajalt isegi kaduda. Seetõttu tuleb esmalt leida massispekter, kus on olemas nii analüüsitava proovile kui ka kalibrantidele vastavad piigid. Seejärel tuleb arvesse võtta spektri signaali summaarset intensiivsust, mis võiks jääda vahemikku 30..70 (ühikuta suurus). Liiga madala intensiivsuse korral jääb signaal nõrgaks ja liiga suure intensiivsuse korral on ICR mõõterakus korraga nii palju ioone, et nende poolt tekitatud elektriväli (ruumlaeng) hakkab mõjutama määratud m/z täpsust.

Kalibrantide signaali tugevus võiks ideaaljuhul moodustada analüütide omast umbes 40%. Kuna kromatograafilise jooksu käigus analüüsiv proov lahjeneb ja kalibrantide intensiivsus ületab seetõttu analüütide oma, tähendab see praktikas, et enamasti tuleb otsida võimalikult intensiivse analüütide signaaliga spektrit, milles on olemas ka sisekalibrantide piigid.

Antud töö käigus modifitseeritud ionisatsioonallika abil oli võimalik reguleerida kalibrantide signaal optimaalsele tasemele. Kui sisekalibrantide signaal on liiga nõrk ei pruugi selle intensiivsuse kõikumise korral kalibrantidelt signaali saada. Liialt tugeva signaali korral hakkab mõõtmise täpsust tugevalt mõjutama ruumlaengu efekt.

5.4.2 Vaiguliste materjalide analüüsimine HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemiga

Kampolvaigu analüüsimisel HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga saadi tulemuseks UV-Vis-kromatogramm, millel oli võimalik eristada 39 piiki. Kokku registreeriti selle jooksu ajal 139 massispektrit. Leiti, et spektrite arv jäi väheseks ning kõikidele kromatograafilistele piikidele polnud võimalik leida vastatavat massispektrit. Seetõttu otsustatigi välja töötada meetmed FT-ICR-MS mõõtmiste ja andmetöötluse kiirendamiseks. Järgnevate analüüsides käigus on rakendatud kõiki eelnevates osades kirjeldatud aja kokkuhoidmise meetmeid.

Peale üksikute erandite olid kõikides kampoli analüüsimisel HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga saadud massispektrites olemas kalibrantidele vastavad piigid ja seetõttu olid kõik need spektrid kalibreeritavad. Üldjuhul jäid kõikide massispektrite intensiivsused vahemikku 10...60. Igas massispektris oli ~30-40 piiki, võrdluseks, ilma kromatograafilise lahutuseta oli FT-ICR massispektromeetriga registreeritud kampoli massispektris piike üle 600.

Tulemuste täpsemaks vaatlemiseks ja esmaseks interpreteerimiseks valiti 18 spektrit vastavalt eelpool kirjeldatud kriteeriumitele. Lisas 6 on esitatud kampolvaigu nESI-FT-ICR-MS spekter ja HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga analüüsimise tulemuseks saadud kromatogramm, mille juurde on välja toodud mõned kromatogrammi piikidele vastavad massispektrid. Nagu esitatud massispektritelt näha, siis ka kromatograaferimise korral pole saavutatud lõplikku lahutust. Seda kinnitab ka esmane interpreteerimine, kus ühele kromatograafilisele piigile vastab massispekter, milles esineb mitmeid kampolvaigule omaseid komponente. See näitab taaskord, kui keeruka materjaliga on tegemist. Siiski on antud massispektrites tunduvalt vähem piike, mistõttu on vaigu koostise uurimine mõnevõrra hõlpsam.

Lisas 6 on välja toodud ka m/z 341,20872 vastav kromatogramm. Sellele m/z väärtusele vastab brutovalem $C_{20}H_{30}O_3Na^+$, mis omakorda viitab suure tõenäosusega oksüdeerunud abietiinhappele (kui vaigu põhikomponent), kuid näiteks on sama brutovalemiga ka kampoli koostisesse kuuluvad oksüdeerunud pimaarhape ja neoabietiinhape. Lisas 6 välja toodud kromatogrammil (vastab m/z 341,20872) on võimalik eristada kolme piiki, millest võib järeldada, et kromatograaferimisega on suudetud lahutada kolm erineva struktuuriga, kuid samale brutovalemile vastavat komponenti. Seega, on antud kromatogrammi abil on võimalik demonstreerida, et HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteem on võimeline eristama sama brutovalemiga ühendeid.

Männitõrva UV-Vis-kromatogrammil on võimalik eristada 25 piiki. Kokku registreeriti 20 minutilise jooksu ajal 313 massispektrit, millest interpreteerimiseks valiti 33. Spektrites olid

olemas kalibrantide piigid ja kõikide jooksu ajal registreeritud spektrite intensiivsed jäid vahemikku 5...75. Üldjuhul oli nendes massispektrites 100-150 piiki. Võrdluseks, ainult MS-ga mõõdetud männitõrva massispektrites on umbes 330 piiki. Seega võib öelda, et männitõrva analüüsimiseks antud süsteem sobib, kuid tulemuste täpsustamise huvides oleks vajalik parandada kromatografeerimise tingimusi. Lisas 7 on esitatud männitõrva nESI-FT-ICR-MS spekter ja HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga analüüsimise tulemuseks saadud kromatogramm, mille juurde on välja toodud mõned kromatogrammi piikidele vastavad massispektrid.

Laevavrakilt pärit vaigulise proovi UV-Vis-kromatogrammis on võimalik eristada 18 piiki. Kokku registreeriti 15 minutilise jooksu käigus 240 massispektrit. Interpreteerimiseks valiti nendest 20 spektrit. Spektrites olid olemas kalibrantide piigid ja kõikide jooksu ajal registreeritud spektrite intensiivsed jäid vahemikku 5...55. Üldjuhul oli nendes massispektrites 60-120 piiki. Võrdluseks, ainult FT-ICR-MS-ga mõõdetud massispektrites on umbes 400 piiki. Lisas 8 on esitatud antud proovi nESI-FT-ICR-MS spekter ja HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga analüüsimise tulemuseks saadud kromatogramm, mille juurde on välja toodud mõned kromatogrammi piikidele vastavad massispektrid. Viimaste analüüsimisel tuvastati männitõrvale (männivaigule) vastavaid komponente, mistõttu võib oletada, et antud proov sisaldas männivaigu töötlemisel saadud materjali, suurima tõenäosusega tõrva.

Lisaks täheldati mitmete analüüsides käigus massispektrites piikide klastrit m/z vahemikus 785...875. Leiti, et klaster pärineb sisekalibrantide ettevalmistusel kasutatud süstlafiltritest tulenevast saastusest.

5.4.3 Kermese analüüsimine HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemiga

Värvainete puhul polnud võimalik punktis 5.4.1 kirjeldatud meetodit tulemuste interpreteerimiseks rakendada kuna nende proovide puhul ei saavutatud piisavat kromatograafilist lahtust (suurima tõenäosusega oli kasutatud värvaine lahus vananenud). Kromatograafiline programm värvainete lahutamiseks töötati välja kasutades looduslikes värvainetes leiduvate komponentide sünteesitud variante. Kromatografeerides aga samadel tingimustel looduslikku päritolu proovi elueerusid kõik komponendid peaaegu samal ajal.

Vaatamata puudulikule kromatograafilisele lahutusele leiti, et kermese analüüs HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga on teostatav. Analüüsi käigus registreeriti kalibreeritavad ja sobiva intensiivsusega massispektrid ning esmased tulemused on esitatud lisas 9.

5.4.4 Järeldused proovide analüüsimise kohta HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga

Järgnevalt on toodud põhilisemad järeldused, mis tehti HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemi testimisel vaiguliste materjalide ja värvainete analüüsimisel:

- Kromatograafilise lahutuse olemasolu lihtsustas massispektreid märgatavalt. Piikide arv LC-MS süsteemiga registreeritud massispektrites oli mitmeid kordi väiksem kui otsese MS-ga registreeritud massispektrites.
- Näidati, et antud süsteemiga on võimalik lahutada sama brutoalmiga komponente.
- Süsteemiga on võimalik registreerida mitmeid massispektreid ühe kromatograafilise piigi kohta – see annab võimaluse valida mitme massispektri vahel. Seega on FT-ICR-MS-i võimalik edukalt kasutada LC-MS süsteemi detektorina, ilma et info kaotsi läheks.
- Kõik HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemiga registreeritud massispektrid sisaldasid kalibrantide piike ja olid kalibreeritavad (m/z nihked jäid alla üldiselt alla 1 ppm-i, alati alla 2 ppm-i). Kalibrantide intensiivsus spektrites oli piisavalt kõrge ja stabiilne. Samuti oli edukalt võimalik jooksu käigus reguleerida kalibrantide intensiivsust massispektris parajale tasemele.

Seega võib öelda, et koostatud HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteem võimaldab keerukaid looduslikke materjale analüüsida ning annab täpsustavat informatsiooni selliste ainete koostise kohta.

6 **Kokkuvõte**

Käesoleva magistritöö põhieesmärgiks oli välja töötada HPLC ja nESI-FT-ICR-MS instrumente kombineeriv LC-MS süsteem, mida rakendada keeruliste looduslike proovide analüüsimiseks.

Süsteemi koostamiseks tuli lahendada kolm ülesannet: HPLC ja FT-ICR-MS instrumentide füüsiline ühendamine, sisekalibrantide lisamine süsteemi FT-ICR-MS mõõtmistäpsuse parandamise jaoks ja FT-ICR-MS mõõtmiste ajakulu vähendamine.

Instrumentide ühendamiseks seati üles süsteem vedelikuvoolu suunamiseks HPLC-st massispektromeetrisse. Voolusüsteemi lisati kaks voolujagamispunkti, millest esimese eesmärk on vähendada HPLC-st tuleva vedeliku vooluhulka tasemele, millega nESI allikas on võimeline töötama. Teise voolujaotuspunkti eesmärk on pakkuda võimalust voolukiirust nESI allikas peenhäälestada, et tagada stabiilsem pihustus.

Teise ülesandena oli vaja vedelikuvoolule süsteemis lisada sisekalibrante massispektromeetri m/z telje kalibreerimiseks. Sisekalibrante oli vaja süsteemi lisada peale HPLC-d aga enne massispektromeetrit. Leiti, et selleks on kõige otstarbekam modifitseerida nESI allikat nii, et see oleks võimeline ioniseerima korraga kahest eri pihustist tulevat vedelikuvoolu. Lisaks on võimalik modifitseeritud ioonallikaga reguleerida sisekalibrantide ja analüütide suhtelist intensiivsust massispektrites.

Üks olulisemaid probleeme, mis antud süsteemi koostamisel oli vaja lahendada puudutab aega, mis kulub ühe FT-ICR-MS massispektri salvestamiseks ja esitamiseks. Üldiselt võtab FT-ICR-MS spektri registreerimine nii kaua aega, et muuta kromatograafilise jooksu tulemuste interpreteerimine keerukaks. Informatsioon võib kaotsi minna kuna massispektri salvestamiseks kulub liiga kaua aega. Mõõtmiste kiirendamiseks leiti kolm viisi. Esiteks valiti spektri registreerimisel optimaalsed andmetöötlusparameetrid, et hoida andmepunktide arvu võimalikult madalana ning viia andmetöötlus läbi võimalikult kiiresti. Teiseks optimeeriti FT-ICR-MS mõõteprogrammi etappide ajalist kestust. Kolmandaks programmeeriti mõõteprogramm täiesti ümber selliselt, et mitmed spektri registreerimise etapid saaksid toimuda paralleelselt, säästes nõnda aega. Nende võtetega vähendati ühe massispektri registreerimisele kuluvat aega 16 sekundi pealt 4 peale, mis on märkimisväärne ajavõit kromatografeerimise seisukohalt.

Süsteemi testimiseks analüüsiiti koostatud HPLC-nESI-FT-ICR-MS süsteemiga looduslikke vaigulisi materjale ja värvaineid. Leiti, et välja töötatud LC-MS instrumendiga on võimalik registreerida kvaliteetseid massispektreid terve kromatograafilise jooksu käigus. Saadud massispektreid oli märkimisväärselt lihtsam interpreteerida kui otsese FT-ICR-MSiga saadud spektreid ning tänu kromatograafilisele lahutusele oli võimalik eristada sama brutovalemiga komponente.

7 **Kasutatud allikad**

1. J.S. Mills, R. White, *The Organic Chemistry of Museum Objects*, Butterworth-Heinemann, Oxford, 1999, pp. 95-146.
2. K. Fiebach, D. Grimm, *Resins, Natural*, Ullmanns Encycl. Ind. Chem., Vol 31, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, pp. 477-492.
3. P.M.P. Colombini, F. Modugno, *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*, John Wiley & Sons, 2009, pp. 3-22.
4. G. Chiavari, D. Fabbri, S. Prati, Characterisation of natural resins by pyrolysis—Silylation, *Chromatographia* 55 (2002) 611–616.
5. G. Chiavari, D. Fabbri, R. Mazzeo, P. Bocchini, G.C. Galletti, Pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry of natural resins used for artistic objects, *Chromatographia* 41 (1995) 273–281.
6. B.H. Stuart, *Analytical Techniques in Materials Conservation*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2007, pp. 11-318
7. G. Balakina, V. Vasiliev, E. Karpova, V. Mamatyuk, HPLC and molecular spectroscopic investigations of the red dye obtained from an ancient Pazyryk textile, *Dyes Pigments*. 71 (2006) 54–60.
8. I. Degano, E. Ribechini, F. Modugno, M.P. Colombini, Analytical Methods for the Characterization of Organic Dyes in Artworks and in Historical Textiles, *Appl. Spectrosc. Rev.* 44 (2009) 363–410.
9. F. Casadio, L. Toniolo, The analysis of polychrome works of art: 40 years of infrared spectroscopic investigations, *J. Cult. Herit.* 2 (2001) 71–78.
10. S. Prati, G. Sciutto, R. Mazzeo, C. Torri, D. Fabbri, Application of ATR-far-infrared spectroscopy to the analysis of natural resins, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3081–3091.
11. H.G.M. Edwards, P. Vandenabeele, eds., *Analytical archaeometry: selected topics*, RSC Publishing, Cambridge, 2012, pp. 345-442
12. R.H. Brody, H.G.M. Edwards, A.M. Pollard, Fourier transform-Raman spectroscopic study of natural resins of archaeological interest, *Biopolymers*. 67 (2002) 129–141.
13. S. Sadhra, High-performance liquid chromatography of unmodified rosin and its applications in contact dermatology, *J Chromatogr B.* (1997) 10.
14. I. Karapanagiotis, Y. Chrysoulakis, Investigation of Red Natural Dyes Used in Historical Objects by HPLC-DAD-MS, *Ann. Chim.* 96 (2006) 75–84.
15. J. Orska-Gawryś, I. Surowiec, J. Kehl, H. Rejniak, K. Urbaniak-Walczak, M. Trojanowicz, Identification of natural dyes in archeological Coptic textiles by liquid chromatography with diode array detection, *J. Chromatogr. A.* 989 (2003) 239–248.
16. K. Hroboňová, D.J. Lehotay, I. Skačáni, J. Čížmárik, HPLC Determination and MS Identification of Dehydroabietic Acid and Abietic Acid in Propolis, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28 (2005) 1725–1735.
17. P. Martin, P. Archier, C. Vieillescazes, M.S. Pistre, HPLC coupled with fluorimetric detection for the identification of natural resins in archaeological materials, *Chromatographia*. 53 (2001) 380–384.
18. F. Han, Y. Li, X. Mao, R. Xu, R. Yin, Characterization of chemical constituents in *Rhodiola Crenulate* by high-performance liquid chromatography coupled with Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer (HPLC-FT-ICR MS), *J. Mass Spectrom.* 51 (2016) 363–368.

19. W. Schrader, H.-W. Klein, Liquid chromatography/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (LC-FTICR MS): an early overview, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 1013-1024.
20. M.R. Emmett, F.M. White, C.L. Hendrickson, S.D.-H. Shi, A.G. Marshall, Application of micro-electrospray liquid chromatography techniques to FT-ICR MS to enable high-sensitivity biological analysis, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 333–340.
21. T.B. Walk, A.W. Trautwein, H. Richter, G. Jung, ESI Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (ESI-FT-ICR-MS): A Rapid High-Resolution Analytical Method for Combinatorial Compound Libraries, *Angew. Chem. Int. Ed.* 38 (1999) 1763–1765.
22. J. Zhang, G. McCombie, C. Guenat, R. Knochenmuss, FT-ICR mass spectrometry in the drug discovery process, *Drug Discov. Today*. 10 (2005) 635–642.
23. J.L. Frahm, B.E. Howard, S. Heber, D.C. Muddiman, Accessible proteomics space and its implications for peak capacity for zero-, one- and two-dimensional separations coupled with FT-ICR and TOF mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 281–288.
24. W. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, Third Edition, CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 3-11
25. R.E. Ardrey, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry: An Introduction*, 1st ed., Wiley, Chichester, 2003, pp. 6-15
26. D. Harvey, *Modern analytical chemistry*, McGraw-Hill, Boston, 2000, pp. 827-843
27. E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007, pp. 43-163
28. L. Konermann, E. Ahadi, A.D. Rodriguez, S. Vahidi, Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2–9.
29. R.B. Cole, *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2011, pp. 4-385.
30. B. Kovačević, D. Barić, Z.B. Maksić, Basicity of exceedingly strong non-ionic organic bases in acetonitrile —Verkade’s superbases and some related phosphazenes, *New J Chem.* 28 (2004) 284–288.
31. D.P.H. Smith, The Electrohydrodynamic Atomization of Liquids, *IEEE Trans. Ind. Appl.* IA-22 (1986) 527–535.
32. Y. Qi, P.B. O’Connor, Data processing in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 33 (2014) 333–352..
33. A.G. Marshall, Milestones in fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry technique development, *Int. J. Mass Spectrom.* 200 (2000) 331–356.
34. E.A. Dimitrakoudi, S.A. Mitkidou, D. Urem-Kotsou, K. Kotsakis, J. Stephanidou-Stephanatou, J.A. Stratis, Characterization by Gas Chromatography—Mass Spectrometry of Diterpenoid Resinous Materials in Roman-Age Amphorae from Northern Greece, *Eur. J. Mass Spectrom.* 17 (2011) 581–591..
35. C. Menor-Salván, M. Najarro, F. Velasco, I. Rosales, F. Tornos, B.R.T. Simoneit, Terpenoids in extracts of Lower Cretaceous ambers from the Basque-Cantabrian Basin (El Soplao, Cantabria, Spain): Paleochemotaxonomic aspects, *Org. Geochem.* 41 (2010) 1089–1103.

8 Lisad

Lisa 1 lk 41

Lisa 2 lk 42

Lisa 3 lk 43

Lisa 4 lk 44

Lisa 5 lk 45

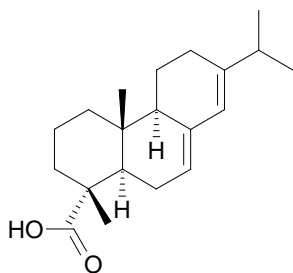
Lisa 6 lk 48

Lisa 7 lk 50

Lisa 8 lk 51

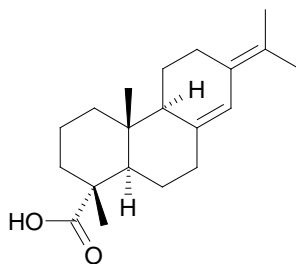
Lisa 9 lk 52

LISA 1 - Kampolvaigu põhikomponentide struktuurvalemid koos brutovalemitega. [1]



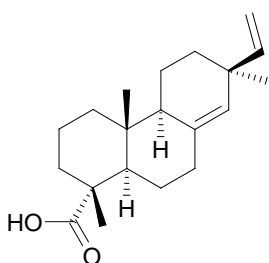
Abietiinhape $C_{20}H_{30}O_2$

M=302,22458 g/mol



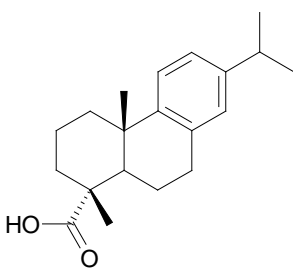
Neoabietiinhape $C_{20}H_{30}O_2$

M=302,22458 g/mol



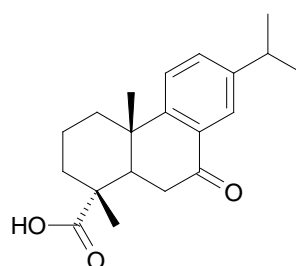
Pimaarhape $C_{20}H_{30}O_2$

M=302,22458 g/mol



Dehüdroabietiinhape $C_{20}H_{28}O_2$

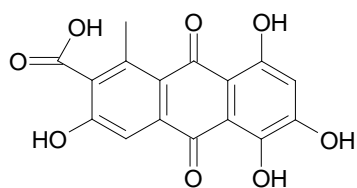
M=300,20893 g/mol



7-oksodehüdroabietiinhape $C_{20}H_{26}O_3$

M=314,18819 g/mol

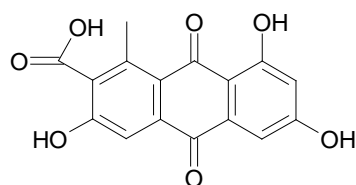
LISA 2 – Kermese põhikomponentide struktuurvalmid koos brutovalemitega. [1]



Kermese põhikomponent

kermeshape $C_{16}H_{10}O_8$

$M=330,03757$ g/mol

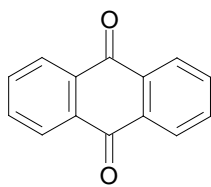


Kermese komponent

flavokermeshape $C_{16}H_{10}O_7$

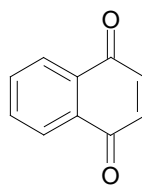
$M=314,04265$ g/mol

Antrakinooni ja naftokinooni (kermeses sisalduvad kinoonid) struktuurvalemid koos brutovalemitega. [1]



Antrakinoon $C_{14}H_8O_2$

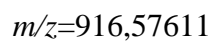
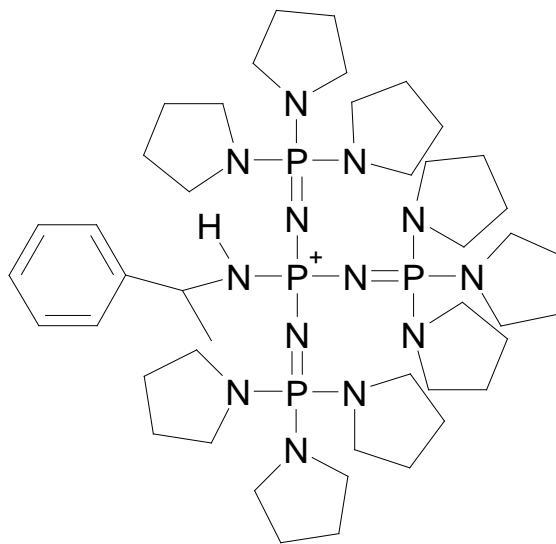
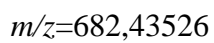
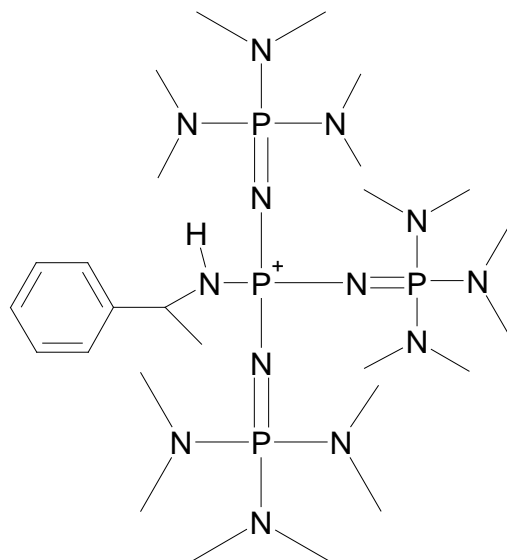
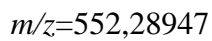
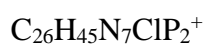
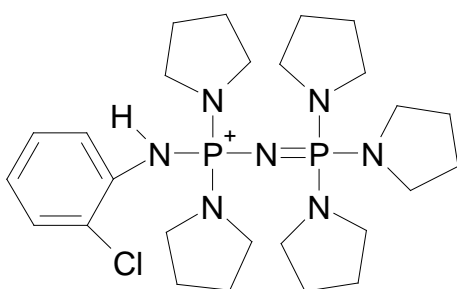
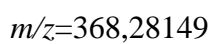
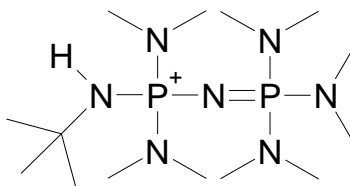
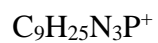
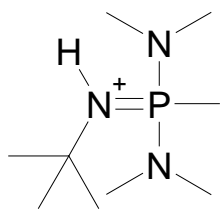
$M=208,05243$ g/mol



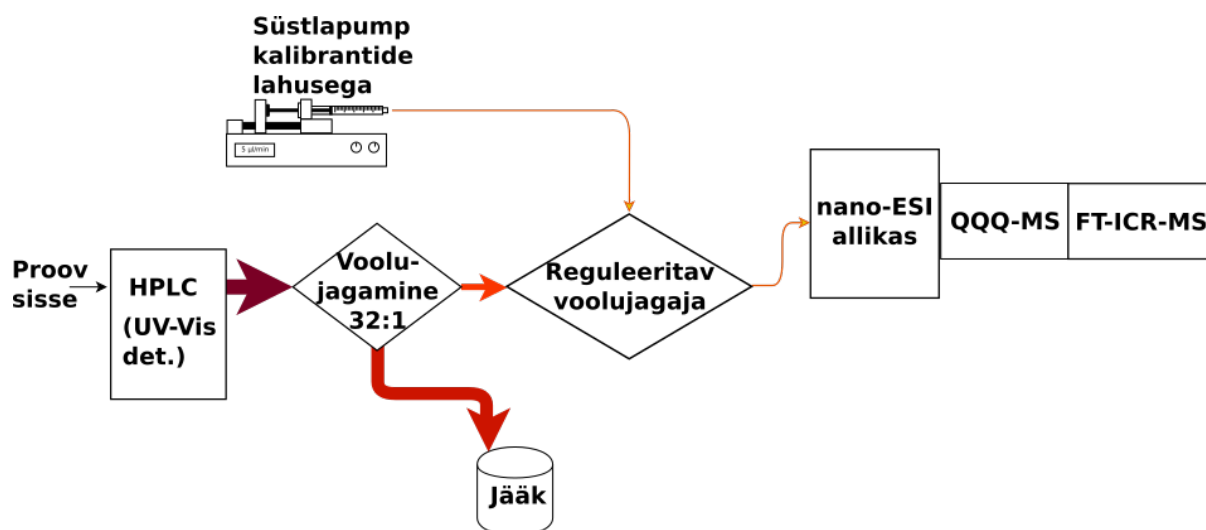
Naftokinoon $C_{10}H_6O_2$

$M=158,03678$ g/mol

LISA 3 - Töös kasutatud fosfaseeniumioonide struktuurvalemid koos brutovalmitega



LISA 4 – HPLC-nESI-FT-ICR-MS esialgne skeem



LISA 5 – Väljavõtted FT-ICR-MS mõõteprogrammist. Paremalt veerus modifitseerimata mõõteprogramm, vasakul modifitseeritud mõõteprogramm.

Algne (modifitseerimata) FT-ICR-MS programm	Modifitseeritud FT-ICR-MS programm
Synthesizer Trigger Event [00]: Ion Guide RF Burst The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: -100.000 ms Absolute Delay: 1000.000 ms Width: 125.000 ms Frequency: 2900.000 kHz Amplitude: 180.000 Volts (b-p)	Synthesizer Trigger Event [00]: Ion Guide RF Burst The delay of this event is linked to the beginning of the Hex DC Offset [01] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 2784.536 ms Width: 125.000 ms Frequency: 2900.000 kHz Amplitude: 180.000 Volts (b-p)
Arb Waveform Trigger Event [00]: Arbitrary Waveform The delay of this event is linked to the end of the Trapping-Quad [03] event. Delta Delay: 80.000 ms Absolute Delay: 6180.000 ms Width: 65.536 ms Amplitude: 100.000 Volts (b-p) DAC Rate: 8000000 Hz Sample Points: 524288 Filter Setting: 5 Waveform Description... Add Power m/z: 60.000 to 1100.000 @ 100%	Arb Waveform Trigger Event [00]: Arbitrary Waveform Delay: 1500.000 ms Width: 65.536 ms Amplitude: 100.000 Volts (b-p) DAC Rate: 8000000 Hz Sample Points: 524288 Filter Setting: 5 Waveform Description... Add Power m/z: 60.000 to 1100.000 @ 100%
Shutter Pulse Event [00]: TTL Pulse The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: -80.000 ms Absolute Delay: 1020.000 ms Width: 85.000 ms	Shutter Pulse Event [00]: TTL Pulse The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: -80.000 ms Absolute Delay: 2804.536 ms Width: 85.000 ms
Valve 2 - Analyzer Event [00]: TTL Pulse The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 1100.000 ms Width: 80.000 ms	Valve 2 - Analyzer Event [00]: TTL Pulse The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 2884.536 ms Width: 80.000 ms
Valve 1 - Source Event [00]: TTL Pulse Delay: 0.000 ms Width: 5.000 ms	Valve 1 - Source Event [00]: TTL Pulse Delay: 0.000 ms Width: 5.000 ms
Inner Rings Event [00]: DAC Init to 0.300 V Event [01]: DAC Pulse to 8.000 V Delay: -5.000 ms Width: 5.000 ms	Inner Rings Event [00]: DAC Init to 0.300 V Event [01]: DAC Pulse to 8.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Trapping-Quad [02] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 2769.536 ms Width: 5.000 ms

LISA 5 jätkub

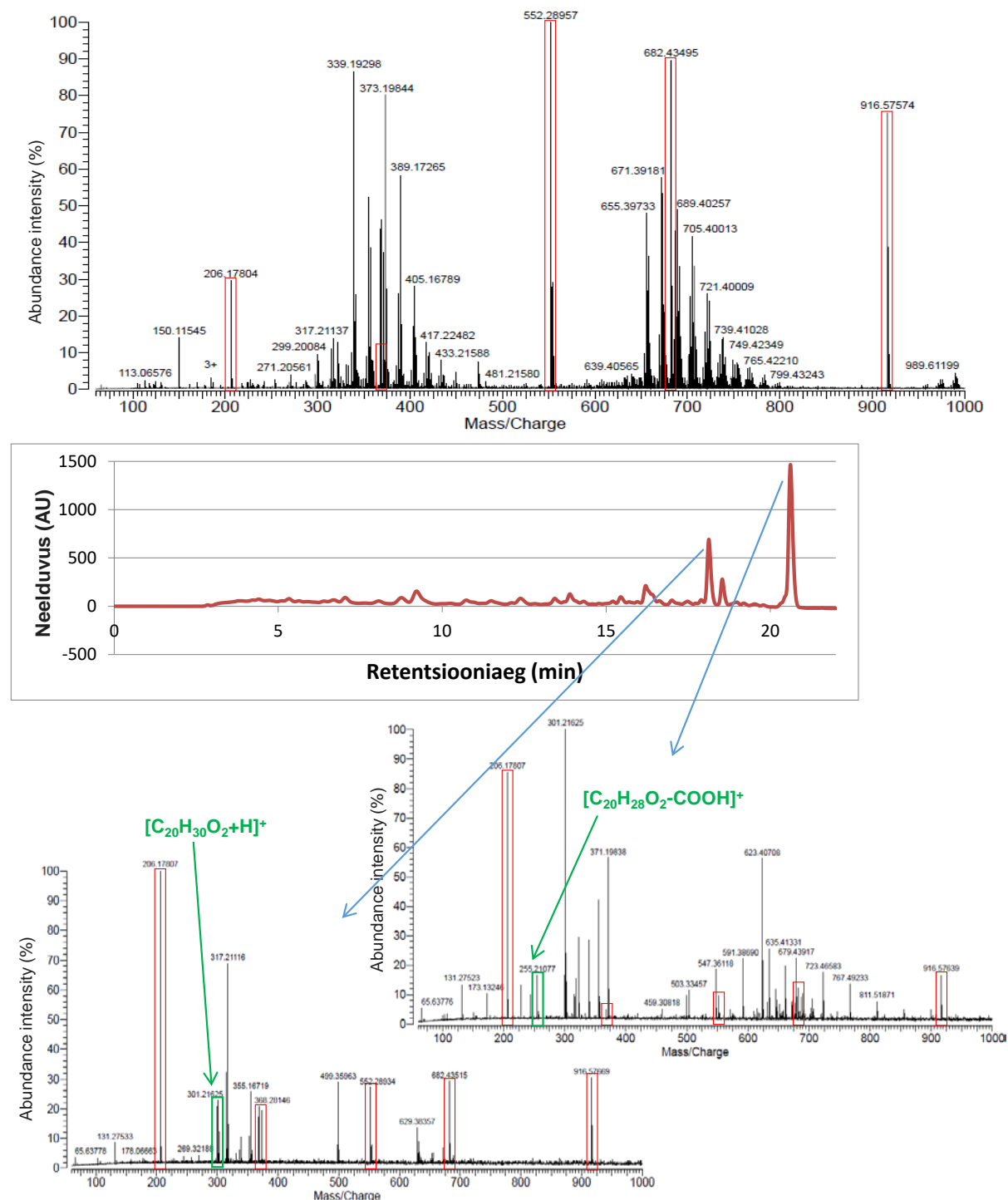
Algne (modifitseerimata) FT-ICR-MS programm	Modifitseeritud FT-ICR-MS programm
Trapping-Quadrupole Event [00]: DAC Init to 10.000 V Event [01]: DAC Pulse to -30.000 V Delay: -5.000 ms Width: 10.000 ms Event [02]: DAC Pulse to 0.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: -2.000 ms Absolute Delay: 1098.000 ms Width: 3.500 ms Event [03]: DAC Ramp to 1.500 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: 4500.000 ms Absolute Delay: 5600.000 ms Width: 500.000 ms	Trapping-Quadrupole Event [00]: DAC Init to 10.000 V Event [01]: DAC Ramp to 1.500 V The delay of this event is linked to the beginning of the Arb. Waveform [00] event. Delta Delay: -580.000 ms Absolute Delay: 920.000 ms Width: 500.000 ms Event [02]: DAC Step to -30.000 V The delay of this event is linked to the end of the TD_switch [01] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 2769.536 ms Event [03]: DAC Step to 10.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Trapping-Quad [02] event. Delta Delay: 10.000 ms Absolute Delay: 2779.536 ms Event [04]: DAC Pulse to 0.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: -2.000 ms Absolute Delay: 2882.536 ms Width: 3.500 ms
Hexapole Entrance Event [00]: DAC Init to 30.000 V Event [01]: DAC Step to -6.500 V Delay: 100.000 ms Event [02]: DAC Step to 10.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex DC Offset [01] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 1000.000 ms	Hexapole Entrance Event [00]: DAC Init to 10.000 V Event [01]: DAC Step to -6.500 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex Entrance [02] event. Delta Delay: -1000.000 ms Absolute Delay: 1784.536 ms Event [02]: DAC Step to 10.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex DC Offset [01] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 2784.536 ms
Hexapole DC Offset Event [00]: DAC Init to -10.000 V Event [01]: DAC Ramp to 5.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: -100.000 ms Absolute Delay: 1000.000 ms Width: 100.000 ms	Hexapole DC Offset Event [00]: DAC Init to -10.000 V Event [01]: DAC Ramp to 5.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Trapping-Quad [03] event. Delta Delay: 5.000 ms Absolute Delay: 2784.536 ms Width: 100.000 ms
Hexapole EXIT Event [00]: DAC Init to 30.000 V Event [01]: DAC Step to -8.000 V Delay: 1100.000 ms	Hexapole EXIT Event [00]: DAC Init to 30.000 V Event [01]: DAC Step to -8.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex DC Offset [01] event. Delta Delay: 100.000 ms Absolute Delay: 2884.536 ms
Shutter DC Event [00]: DAC Init to 30.000 V Event [01]: DAC Step to -15.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 1100.000 ms	Shutter DC Event [00]: DAC Init to 30.000 V Event [01]: DAC Step to -15.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 2884.536 ms
Ion Guide Offset Event [00]: DAC Init to -5.000 V	Ion Guide Offset Event [00]: DAC Init to -5.000 V

LISA 5 jätkub

Algne (modifitseerimata) FT-ICR-MS programm	Modifitseeritud FT-ICR-MS programm
TD Switch Event [00]: DAC Init to 0.000 V Event [01]: DAC Pulse to 5.000 V The delay of this event is linked to the end of the Arb. Waveform [00] event. Delta Delay: 4.000 ms Absolute Delay: 6249.536 ms Width: 1200.000 ms	TD Switch Event [00]: DAC Init to 0.000 V Event [01]: DAC Pulse to 5.000 V The delay of this event is linked to the end of the Arb. Waveform [00] event. Delta Delay: 4.000 ms Absolute Delay: 1569.536 ms Width: 1200.000 ms
Pos/Neg 0=POS 5=NEG Event [00]: DAC Init to 0.000 V	Pos/Neg 0=POS 5=NEG Event [00]: DAC Init to 0.000 V
Inter-Hex lens Event [00]: DAC Init to -5.000 V	Inter-Hex lens Event [00]: DAC Init to -5.000 V
HexRFInt Event [00]: DAC Init to 0.000 V Event [01]: DAC Step to 5.000 V Delay: 0.000 ms Event [02]: DAC Step to 0.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: 100.000 ms Absolute Delay: 1200.000 ms	HexRFInt Event [00]: DAC Init to 0.000 V Event [01]: DAC Step to 5.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex Entrance [01] event. Delta Delay: -100.000 ms Absolute Delay: 1684.536 ms Event [02]: DAC Step to 0.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the HexRFInt [01] event. Delta Delay: 1300.000 ms Absolute Delay: 2984.536 ms
Hex RF Amp #1 Event [00]: DAC Init to 0.000 V Event [01]: DAC Step to 500.000 V Delay: 0.000 ms Event [02]: DAC Step to 0.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the Hex EXIT [01] event. Delta Delay: 100.000 ms Absolute Delay: 1200.000 ms	Hex RF Amp #1 Event [00]: DAC Init to 0.000 V Event [01]: DAC Step to 500.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the HexRFInt [01] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 1684.536 ms Event [02]: DAC Step to 0.000 V The delay of this event is linked to the beginning of the HexRFInt [02] event. Delta Delay: 0.000 ms Absolute Delay: 2984.536 ms
Hex RF Amp #2 Event [00]: DAC Init to 0.000 V	Hex RF Amp #2 Event [00]: DAC Init to 0.000 V
Detection Event Direct Mode (Broadband) Detection Excitation Event: Arb. Waveform [00] (Arb Waveform) Detect: m/z 60.000 to 1000.000 Start Time: 6249.632 ms Acquisition Time: 524.288 ms ADC Rate: 4000000 Hz Transient Points: 2097152 ADC Gain: 1	Detection Event Direct Mode (Broadband) Detection Excitation Event: Arb. Waveform [00] (Arb Waveform) Detect: m/z 108.000 to 1000.000 Start Time: 1569.632 ms Acquisition Time: 1048.576 ms ADC Rate: 2000000 Hz Transient Points: 2097152 ADC Gain: 1

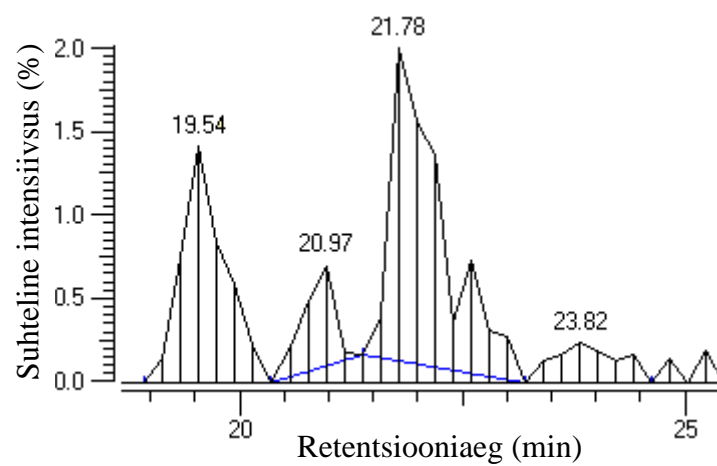
LISA 6 – Kampolvaigu HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga analüüsimise tulemused

Üleval on toodud kampoli massispekter, keskel kampoli kromatogramm, all kahele kromatograafilisele piigile vastavad massispektrid. Spektrites on punase kastiga märgitud sisekalibrandid, rohelisega on esitatud mõned interpreteeringud [1].



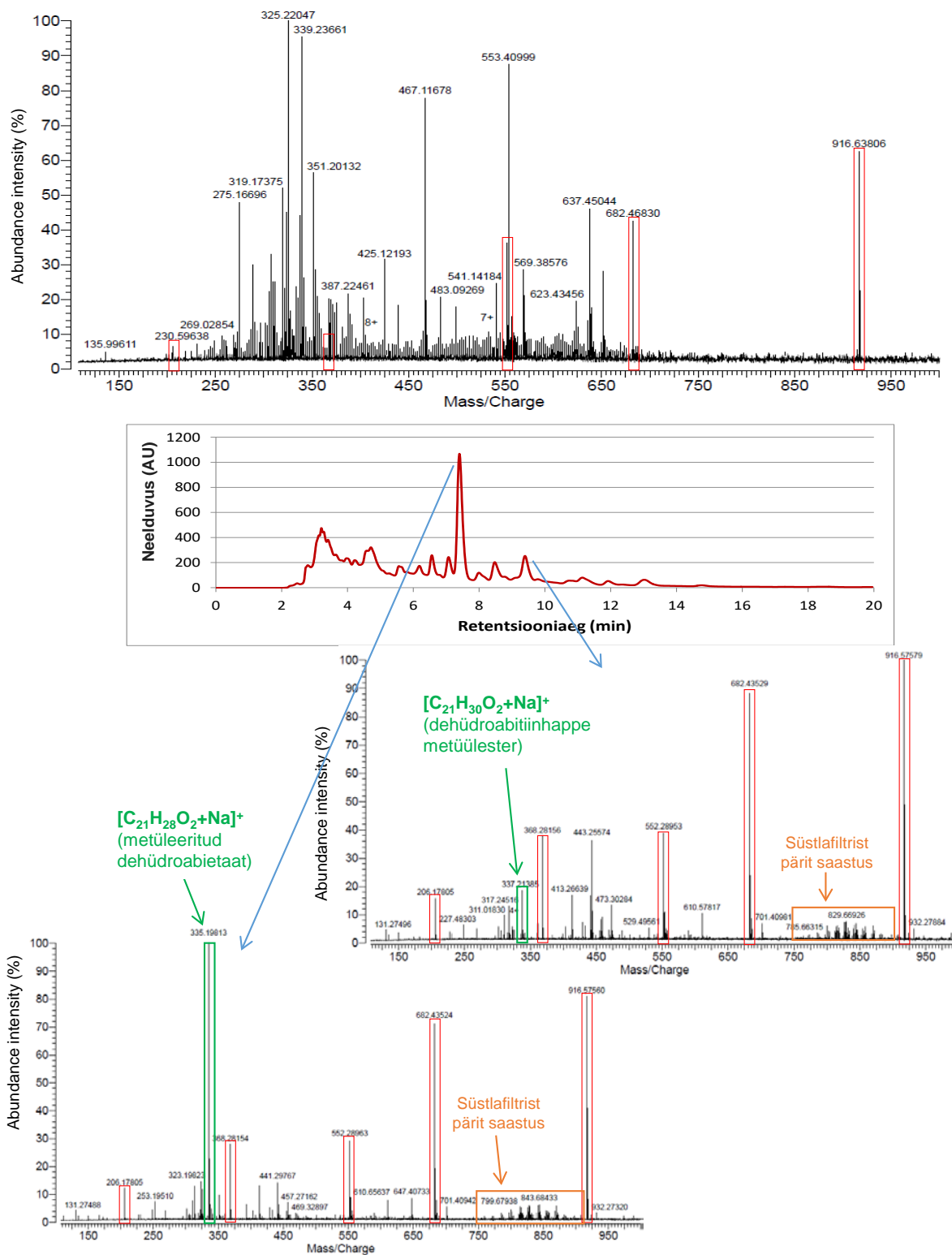
LISA 6 jätkub

Siin on toodud m/z väärtusele 341,20872 vastav kromatogramm, millel on näha kolm eristuvat piiki.



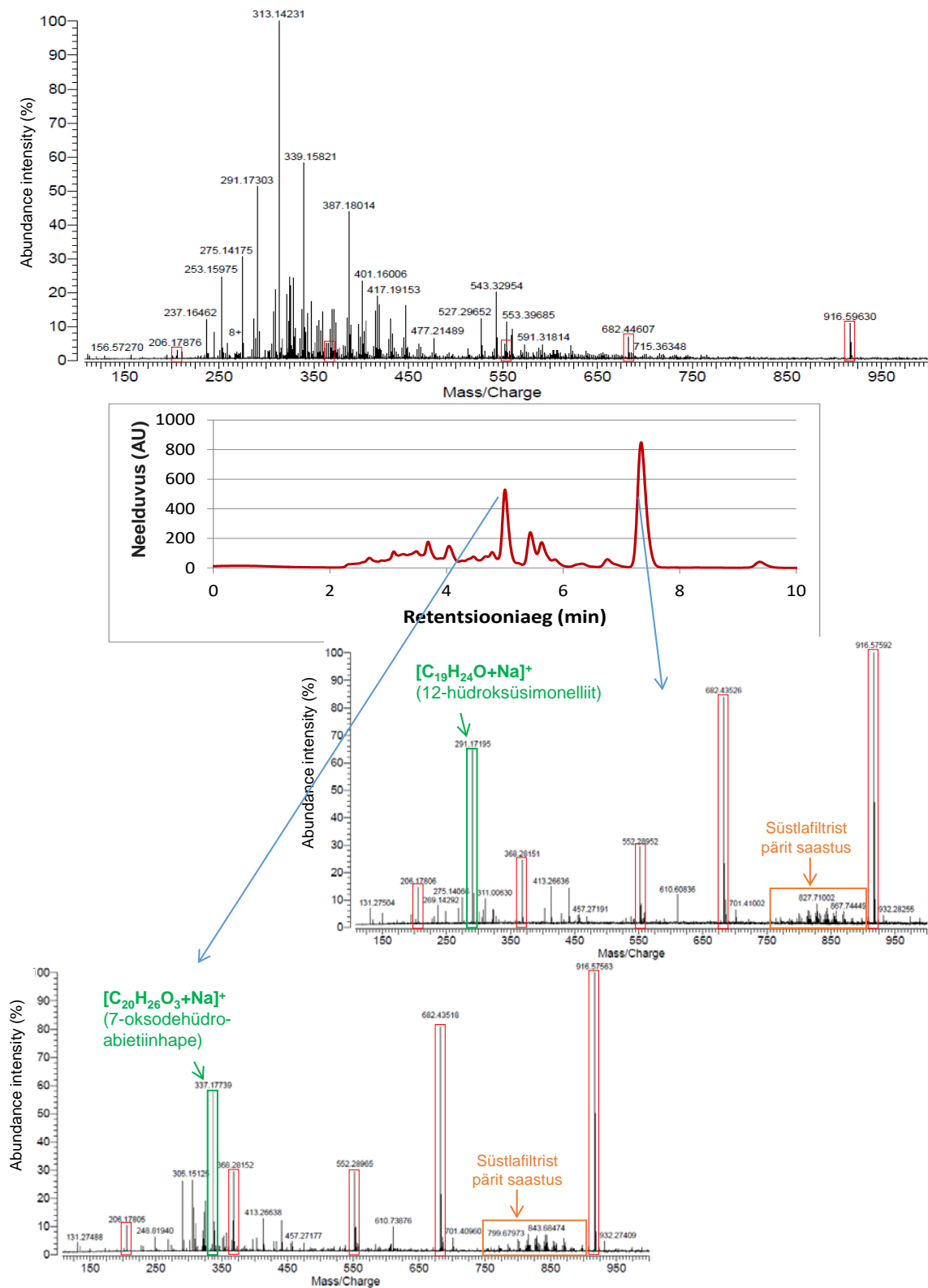
LISA 7 – Männitõrva HPLC-nESI-FT-ICR-MS-ga analüüsimise tulemused

Üleval on toodud männitõrva massispekter, keskel männitõrva kromatogramm, all kahele kromatograafilisele piigile vastavad massispektrid. Spektrites on punase kastiga märgitud sisekalibrandid, rohelisega on välja toodud mõned interpreteeringud [34].



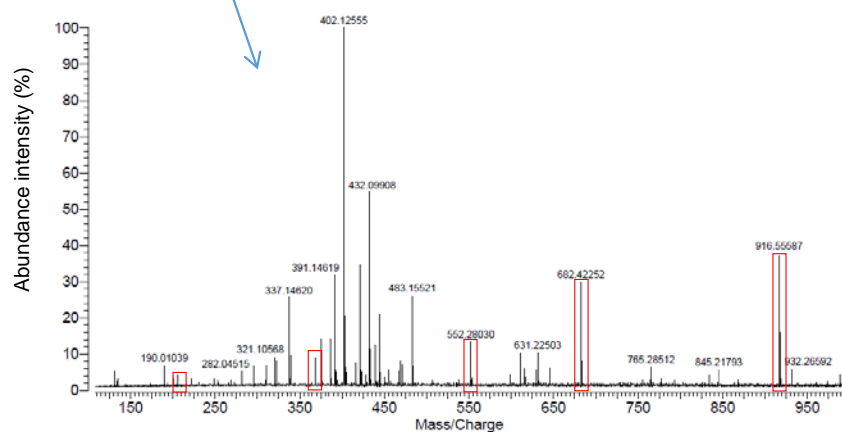
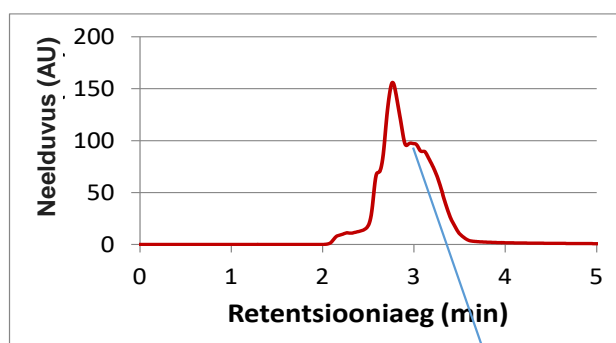
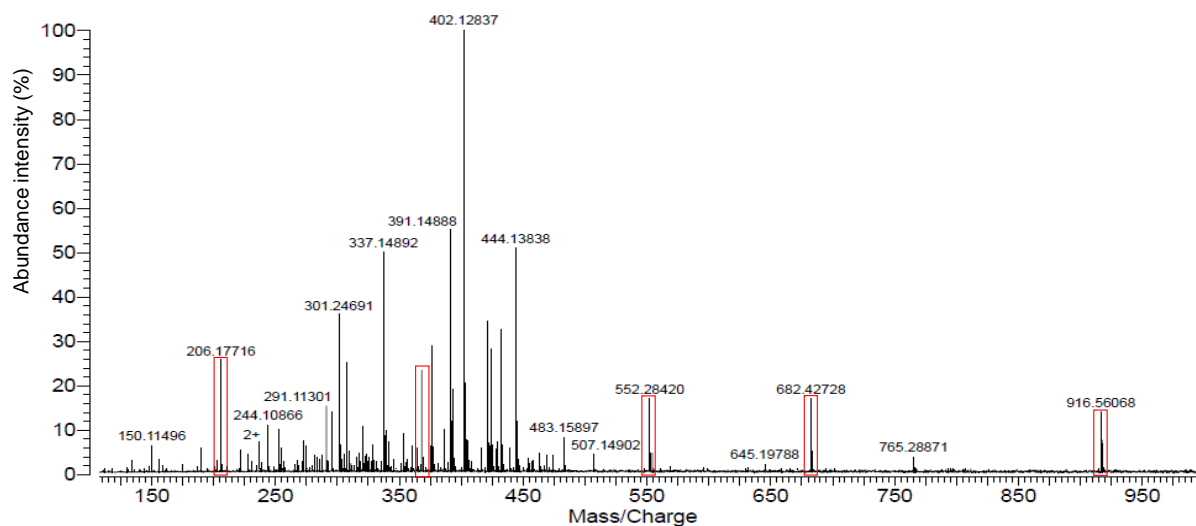
LISA 8 – Nargen1 proovi HPLC-nESI-FT-ICR-MS tulemused

Üleval on toodud Nargen1 massispekter, keskel Nargen1 kromatogramm, all kahele kromatograafilisele piigile vastavad massispektrid. Spektrites on punase kastiga märgitud sisekalibrandid, rohelisega on toodud mõned interpreteeringud [1,3,35].



LISA 9 – Kermese HPLC-nESI-FT-ICR-MS tulemused

Üleval on toodud proovi massispekter, keskel proovi kromatogramm, all kahele kromatograafilisele piigile vastavad massispektrid. Spektrites on punase kastiga märgitud sisekalibrandid.



Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Markus Veinla,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose HPLC ja FT-ICR-MS tandeminstrumendi arendamine keerukate looduslike materjalide analüüsimiseks,

mille juhendajad on Anu Teearu-Ojakäär ja dotsent Koit Herodes,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Tartus, 31.05.19